Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-W. Altmann

Untersuchungen zum Turnover von Kollagen in der Glomerulären Basalmembran und der Schwanzsehne junger, alter und diabetischer Ratten

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dipl. Ing. Thomas Heck
aus Aschaffenburg

Würzburg, November 1980

1981

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-W. Altmann

Untersuchungen zum Turnover von Kollagen in der Glomerulären Basalmembran und der Schwanzsehne junger, alter und diabetischer Ratten

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dipl.Ing. Thomas Heck
aus Aschaffenburg

Würzburg, November 1980

Referent: Professor Dr. med. W. Romen

Korreferent: Professor Dr. med. H.-W. Altmann

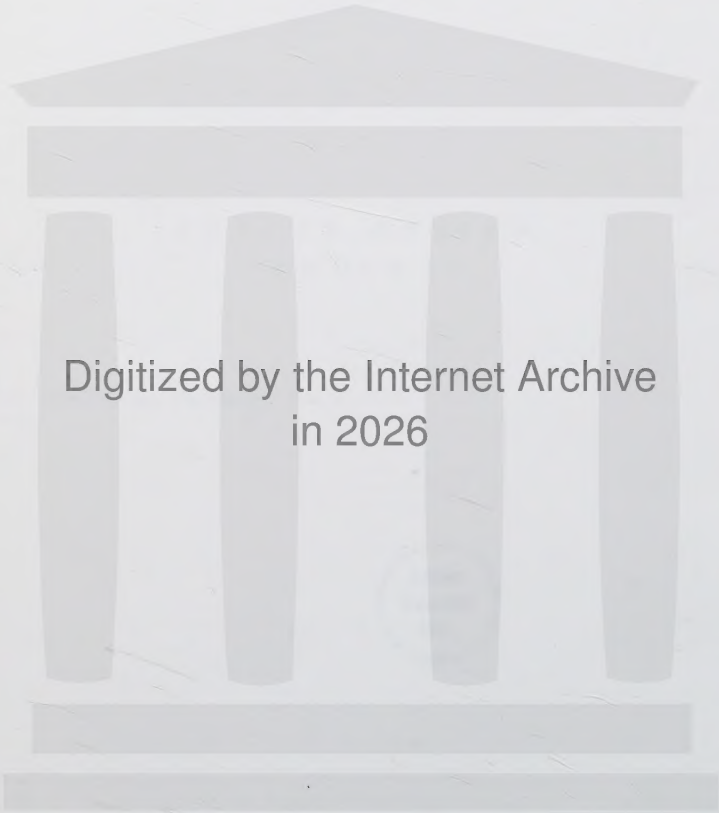
Dekan: Professor Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 15.1.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN
GEWIDMET


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0012

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B. ALLGEMEINER TEIL	3
I. Morphologische und biochemische Grundlagen	3
1. Feinbau der Kapillarschlinge, Morphologie zum Synthese-Abbauproblem	3
2. Ein Baustein der glomerulären Basalmembran: Kollagen	4
a. Allgemeines zur Biochemie des Kollagens	5
b. Biosynthese und Abbau von Kollagen	6
c. Biochemie der GBM (Kollagen-Typ IV)	7
II. Pathologische Veränderungen kollagenhaltiger Gewebe beim Diabetes mellitus	9
1. Extrarenale Veränderungen	9
2. Die glomeruläre Basalmembran beim Diabetes mellitus	11
III. Theoretische Überlegungen zu Umsatzbestimmungen von Geweben durch Tracergabe	13
1. Weg des injizierten Tracers im Organismus	13
2. Termini technici zu Umsatzbestimmungen	15
3. In vivo-Kinetik eines Proteinpools nach Tracergabe	16
C. MATERIAL UND METHODE	19
I. Versuchsübersicht und allgemeine Angaben zum verwendeten Material	19
II. Induktion diabetischer Stoffwechsellage mittels Streptozotocin	21
III. Prüfung des verwendeten ^{3}H-Prolins auf dessen Eignung als Tracersubstanz	21
1. Doppelmarkierungen mit ^{3}H- und ^{14}C-Prolin	22
2. Säurehydrolyse eines Gemisches aus ^{14}C- und ^{3}H-Prolin	23
3. Verwendung von Injektionsgemischen unterschiedlicher spezifischer Aktivität	23

Seite

IV. Überprüfung des Verlaufs der spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum 24

V. Markierung der Versuchsgruppen, Tötung, Entnahme der untersuchten Strukturen 25

VI. Präparation der untersuchten Strukturen 26

1. Isolierung der Glomeruli 26

2. Präparation der glomerulären Basalmembran 28

3. Präparation des Schwanzsehnenkollagens 29

4. Präparation der Leberproteine 29

VII. Aktivitätsmessungen, Aminosäurenanalyse und biochemische Untersuchungen 30

VIII. Auswertung und allgemeines Berechnungsschema 31

D. ERGEBNISSE 34

I. Ergebnisse der VORVERSUCHE 34

1. Konstanz des verwendeten ^{3}H-Prolin Tracers gegenüber Säurehydrolyse 34

2. Ausschluß von Fehlinjektionen 35

3. Metabolisierung von ^{3}H-Prolin 38

a. Abhängigkeit der Prolinmetabolisierung von Zusammensetzung des Injektionspräparates 38

b. Vergleich der Metabolisierung von ^{3}H- und ^{14}C-Prolin 39

4. Spezifische Aktivität des freien Prolins im Serum von Kontrolltieren, diabetischen und alten Ratten 42

a. Metabolisierung des ^{3}H-Prolins zu Tritium-Wasser 42

b. Verlauf der spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum 44

c. Halbwertszeit von freiem Prolin im Serum, Integral der Prolinwerte 44

II. Ergebnisse der HAUPTVERSUCHE 49

1. Entwicklung von Gewicht und Blutzucker nach Diabetisierung mit Streptozotocin 49

2. Isolierung der glomerulären Basalmembran (GBM) 51

Seite

a. Morphologische qualitative und quantitative Beschreibung der isolierten Fraktionen 51

b. Einfluß der Isolierung auf biochemische Zusammensetzung und spezifische Aktivität der glomerulären Einzelfraktionen 58

3. Morphologie des Schwanzsehnenkollagens in Abhängigkeit des Alters der Versuchstiere 60

4. Einfluß des Alters der Versuchstiere auf Einbau- und Hydroxylierungsrate 62

5. Einbauraten und Turnover der Lebern gesunder, diabetischer und alter Tiere 63

6. Befunde des Schwanzsehnenkollagens der drei verschiedenen Versuchsgruppen 66

a. Aminosäurenzusammensetzung des SSK 66

b. Vergleich der Ergebnisse von Einzeltieren 66

c. Spezifische Aktivität des Prolins 70

d. Spezifische Aktivität des OH-Prolins 72

7. Befunde der glomerulären Basalmembran (GBM) gesunder, diabetischer und alter Tiere 74

a. Aminosäurenzusammensetzung der GBM 74

b. Spezifische Aktivität des Prolins 76

c. Spezifische Aktivität des OH-Prolins 78

E. DISKUSSION 80

I. Vorversuche 81

II. Normalbefunde 86

III. Diabetes 96

IV. Wachstum und Alter 100

V. Zur Pathogenese der Glomerulosklerose 104

F. ZUSAMMENFASSUNG 109

G. LITERATURVERZEICHNIS 111

H. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 119

A. EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

Durch die fortschreitende Entwicklung der Therapie des Diabetes mellitus konnte in den letzten Jahrzehnten die Lebenserwartung zukkerkranker Personen entscheidend erhöht werden. In gleichem Maße stieg jedoch die Bedeutung der Spätkomplikationen des Diabetes mellitus. Unter diesen spielt neben der diabetischen Makroangiopathie insbesondere die diabetische Nephropathie klinisch eine herausragende Rolle, denn nach mehr als 20-jähriger Diabetesdauer sterben bis zu 50 % aller Zuckerkranken an dieser Komplikation.

Pathogenetisch läßt sich diese in eine Makro- und Mikroangiopathie der Niere unterteilen. Letztere stellt bei Befall einer besonderen Gefäßstrecke, nämlich der Kapillarschlinge, das Krankheitsbild der Glomerulosklerose (GS) dar. Morphologisch liegt der diabetischen GS stets eine Zunahme des Mesangiums und eine Verbreiterung der glomerulären Basalmembran (GBM) zugrunde. Eine besondere Variante ist dabei die noduläre Form mit Auftreten charakteristischer PAS-positiver Kugeln im Mesangium. Sie wurde bereits 1936 von KIMMELSTIEL und WILSON erkannt.

Die Grundlage des Verständnisses der diabetischen Mikroangiopathie wurde Ende der 50-er Jahre durch erste elektronenmikroskopische Untersuchungen gelegt, mit denen die Verbreiterung der GBM nachgewiesen werden konnte. Biochemische und autoradiographische Arbeiten ergaben, daß die GBM vorwiegend aus einem Kollagen-ähnlichen Glykoprotein besteht, das im wesentlichen von den Epithelzellen der Kapillarschlinge produziert wird.

Die Alteration der GBM bei der GS ist nicht nur quantitativ im Sinne einer Zunahme von BM-Material, sondern möglicherweise auch qualitativ, wobei eindeutige biochemische Veränderungen der Zusammensetzung allerdings noch nicht sicher nachgewiesen sind. Lange Zeit

schien die gesteigerte Synthese von GBM-Material als Erklärung einer verbreiterten GBM naheliegend. Grundsätzlich besteht jedoch ebenso die Möglichkeit eines eingeschränkten Abbaus der GBM-Bestandteile durch die entsprechenden Zellen, vor allem die Mesangialzellen, um zu einer Dickenzunahme zu gelangen. In zahlreichen Arbeiten konnten - z.B. durch Messung geeigneter Enzymaktivitäten - Hinweise gefunden werden, die für die eine oder die andere Hypothese sprechen.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, in einer an Ratten durchgeführten in-vivo Studie mit Hilfe von Tracermethoden die Umsatzparameter von Kollagen in GBM und Referenzkollagen zu ermitteln und somit einen Baustein zur Klärung der Pathogenese der diabetischen Glomerulosklerose zu liefern.

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Morphologische und biochemische Grundlagen

1. Feinbau der Kapillarschlinge, Morphologie zum Synthese-Abbauproblem

Erst die Einführung der elektronenmikroskopischen Technik ermöglichte es, den Feinbau der glomerulären Kapillarschlinge zu verstehen. An ihrem Aufbau sind folgende Zellstrukturen beteiligt: Epithelzelle, Endothelzelle, Mesangialzelle mit Mesangiummatrix und die GBM.

Die Epithelzelle liegt mit ihren Podozyten genannten Ausläufern der GBM von außen, d.h. auf der Seite des Bowman'schen Kapselraums an. KURTZ und FELDMANN konnten bereits 1962 durch Silberimprägnation die Epithelzelle als Quelle der GBM-Bausteine identifizieren. Inzwischen wurden diese Befunde mehrfach bestätigt (siehe ROMEN 1976), auch in vitro durch Synthese von BM-Material durch isolierte glomeruläre Epithelzellen (FOIDART-WILLEMS et al. 1975).

Dagegen kann man der Endothelzelle keine solch eindeutige Funktion im Umsatz der GBM zuschreiben, allenfalls kann ihre Beteiligung am Abbau der genannten Struktur nicht ausgeschlossen werden. Durch ihre weitgefensterten Ausläufer, die die gesamte Innenseite des Kapillarlumens auskleiden, wirken sie als sehr grobes Filter der korpuskulären Bestandteile des Blutes.

Die größte Rolle in der Stützfunktion übernehmen die Mesangialzellen, die außerdem die Mesangiummatrix produzieren. Sie sind durch stets interkapilläre Lage im Zentrum der Kapillarschlinge gekennzeichnet. FARQUHAR und PALADE (1962) konnten beobachten, daß diese Zellen zur Phagozytose mehrerer unterschiedlicher Partikel befähigt sind. Auf ihre spezielle Funktion im Abbau der Bestandteile der GBM

weist der Befund hin, daß nach Mesangiumblockade eine Dickenzunahme der GBM erfolgt (ROMEN und MORATH 1979).

Die GBM selbst läßt elektronenoptisch eine Dreischichtung erkennen: Die Lamina densa - ihr wird die eigentliche Filterfunktion zugesprochen - sowie zwei optisch weniger dichte Schichten, Lamina rara externa und interna. Ihre Dicke beträgt bei der Ratte etwa 100 nm, ihre Porenweite von 7-8 nm läßt die Filtration von Molekülen eines Molekulargewichtes bis 40 000 zu. Bei hoher Vergrößerung ist eine feine fibrilläre Struktur der Lamina densa zu erkennen (s. zus. fassend BARGMANN 1978).

Heute wird allgemein vertreten, daß die Basalmembran ein dünnes, teilweise orientiertes Netz aus etwa 4-5 nm dicken Fibrillen enthält, die in eine amorphe Matrix eingebettet sind. Es ist bisher nicht geklärt, ob diese "Fibrillen" dem Kollagenanteil entsprechen. Die Natur der GBM entspricht physikalisch der eines kolloidalen Gels, worauf hauptsächlich ihre Filterfunktion zurückzuführen ist (WESTBERG 1978).

2. Ein Baustein der glomerulären Basalmembran: Kollagen

Die biochemische Zusammensetzung der GBM wurde schrittweise erkannt. Die intensive Anfärbbarkeit der GBM bei der PAS-Reaktion wies bereits auf ihren Gehalt an Kohlehydraten hin (MC MANUS 1948, LEBLOND et al. 1957). Der hohe Anteil des OH-Prolins in der Aminosäurestruktur ließen GOODMAN et al. 1955 vermuten, ein Glykoprotein in der Art des Kollagens vor sich zu haben. Erst die komplette Aminosäurenanalyse, die in zahlreichen Arbeiten durchgeführt wurde (s. zus. fassend KEFALIDES 1973), ermöglichte es, einen Proteinanteil der Basalmembran als Kollagen zu identifizieren. Im folgenden sei zunächst auf einige Charakteristika des Kollagens eingegangen.

a. Allgemeines zur Biochemie des Kollagens

Kollagen weist gegenüber den anderen bekannten Proteinen einige Besonderheiten auf. Charakteristisch ist die monotone Frequenz der Peptidkette: Gly-X-Y. Etwa ein Drittel aller Aminosäuren ist also Glycin, fast ein weiteres Drittel die Summe aus Prolin und Hydroxyprolin. Kennzeichnend ist ebenso ein relativ hoher Gehalt an Hydroxy-Lysin. An diese Aminosäure sind in wechselnder Menge Disaccharide, insbesondere Glucosyl-Galaktose, gebunden, die die Zuordnung des Kollagens zu den Glykoproteinen rechtfertigen. Insbesondere BEISSWENGER und SPIRO (1970, 1973) schreiben dieser Disaccharid-OH-Lysin Verbindung eine besondere Rolle in Stabilisierung und Strukturierung der GBM zu. Die beiden Aminosäuren OH-Lys und OH-Pro finden sich nur im Kollagen, aber nicht in einem anderen Protein des Körpers, allenfalls in Spuren im Elastin.

Die Polypeptidketten mit oben beschriebener Primärstruktur werden als α-Ketten bezeichnet, sie besitzen ein MG von ca. 100 000. Sie sind in linksgängigen Spiralen gewunden (Sekundärstruktur), jeweils drei von ihnen bilden eine rechtsgängige Superhelix (Tertiärstruktur). Verschiedenartige Primärstruktur der α-Ketten, unterschiedliches färberisches und immunologisches Verhalten und das Vorkommen in verschiedenen Strukturen des Organismus haben zur Einteilung des Kollagens in 5 verschiedene Typen geführt (s. Tab. B 1). Selbstverständlich unterscheiden sie sich jedoch auch in anderen biochemischen und physikalischen Eigenschaften erheblich, so ist etwa der Kohlenhydratgehalt der α-Ketten des Typs IV mit etwa 10% wesentlich höher als der des Typ I - Kollagens (0,5%).

Kollagentyp	Kettenzus.	Häufigstes Vorkommen
I	$(\alpha_1(I))_2\ \alpha_2$	Fibrillen in Haut, Sehne Knochen etc.
II	$(\alpha_1(II))_3$	Hyaliner Knorpel
III	$(\alpha_1(III))_3$	Retikuline Fasern
IV	$(\alpha_1(IV))_3$	Basalmembranen
V	(αA), (αB)	fetale Basalmembranen

Tab. B 1: Varianten des Kollagens (nach TIMPL 1977)

b. Biosynthese und Abbau von Kollagen

Eine weitere Eigenart des Kollagens ist dessen Synthese in Vorstufen, die Prokollagene genannt werden. Die Prokollagenkette ist um 50% länger als die fertige α-Kette, an ihrem Ende findet sich ein eher globulärer Anteil an Proteinen, der vermutlich für die höhere Löslichkeit der Pro-α-Kette verantwortlich ist (TIMPL 1977). Bemerkenswert ist, daß die beträchtlichen Mengen an OH-Pro und OH-Lys nicht direkt in die Peptidkette eingebaut werden, sondern daß die Hydroxylierung erst nach Fertigstellung der Peptidkette erfolgt (bei Prolin etwa 50%). Diese Umwandlung wird von spezifischen Enzymen, Lysinhydroxylase und Prolinhydroxylase an den Zisternen des rauhen ER bewerkstelligt. Hierdurch gewinnen die Pro-α-Ketten beträchtlich an Stabilität, denn nachfolgend beginnt die Faltung zur Tripelhelix. Erst danach und nach Anfügung von Zuckerresten ist die Ausschleusung der Prokollagenmoleküle über die Vesikel des GOLGI-Apparates möglich. Zur Zeit kann noch nicht entschieden werden, ob die Umwandlung des Prokollagens zum Kollagenmolekül intra- und/oder extrazellulär erfolgt. Sicherlich extrazellulär findet jedoch eine

zunehmende Quervernetzung der Moleküle in verschiedenen biochemischen Schritten statt, die zu abnehmender Löslichkeit des Kollagens führt.

Der Abbau des fertig synthetisierten Kollagens erfolgt in sehr unterschiedlichem Maße, in der Regel ist er, verglichen mit anderen Proteinen, jedoch sehr niedrig. Er wird durch eine Zerstörung der Tripelhelix durch spezielle Kollagenasen eingeleitet, der Abbau zu monomeren Fragmenten erfolgt durch lysosomale Enzyme (Kathepsine). MONTFORT und PEREZ-TAMAYO (1975) fanden mit Immunfluoreszenzmethoden die Kollagenase entlang der GBM und im Mesangium verteilt.

c. Biochemie der GBM (Kollagen-Typ IV)

Obwohl der Gehalt an OH-Pro und OH-Lys die Einordnung des BM-Proteins in die Familie der Kollagene sicherlich zuläßt, bestehen gegenüber den bekannten fibrillären Kollagenen doch beträchtliche Unterschiede in der biochemischen Zusammensetzung (s. Tab. B 2).

Auffallend ist der hohe Gehalt an Kohlehydraten, der von den Autoren mit Werten zwischen 7 und 10% angegeben wird (BEISSWENGER und SPIRO 1973, KEFALIDES 1973, SATO et al. 1975). Diese bestehen zum überwiegenden Teil aus Glucose und Galactose, die als Disaccharid in β-glycosidischer Bindung an etwa 80% (!) aller OH-Lys Moleküle gebunden sind. Kennzeichnend ist ebenso, daß etwa 10% des OH-Pro als 3-OH-Pro vorliegen.

Unterschiedliche Methoden in der Aufbereitung des BM-Materials haben zu verschiedenen Vorstellungen über das Strukturmodell der GBM geführt.

Baustein	GBM (Schwein)	Hauttropokollagen (Kalb)
Glycin	208	320
OH-Pro	68	94
OH-Lys	22	7
Cystein	31	45
Asparaginsäure	68	-
Tyrosin	18	-
Glucose	16	1
Galactose	20	2
Mannose	5	-
Fucose	2	-
Hexosamine	11	-
Sialinsäure	4	-

Tab. B 2 : Vergleich der kennzeichnenden Elemente von Kollagen Typ IV und I (in Anteile/1000 Anteile) aus SPIRO 1976

KEFALIDES (1973) unterzog das GBM-Material einer Pepsinverdauung und erhielt eine Peptidkette, deren Wanderungsgeschwindigkeit und hoher Gehalt an OH-Pro und OH-Lys mit der α1-Kette des interstitiellen Kollagens übereinstimmte. Extraktion mit 8M Harnstoff oder Reduktion und Alkylierung erbrachte eine Proteinfraktion, die frei von OH-Pro und OH-Lys war. KEFALIDES schlug daraus ableitend ein Strukturmodell der GBM vor, das die Existenz eines hochmolekularen (MG = 108 000) kollagenähnlichen Glykoproteins (als Kollagen Typ IV definiert), einer niedermolekuaren und einer hochmolekularen Nichtkollagenkomponente beinhaltet.

SPIRO und Mitarbeiter (siehe SPIRO 1976) beschreiben die Löslichkeit von GBM Material durch Behandlung mit Natriumdodecylsulfat oder Harnstoff nach Auflösung der Disulfidbrücken durch Reduktion und Alkylierung. SPIRO vertritt die Ansicht, die GBM bestehe aus einer Vielzahl von Untereinheiten. Ihr MG soll zwischen 25 000 und 205 000 schwanken. Nach ihrem Aminosäure- und Zuckergehalt sieht er Übergänge zwischen kollagenähnlichen bis hin zu kollagenunähnlichen Makromolekülen.

MILLER et al. (1978) stimmen der Auffassung SPIROs zu, die Basalmembran enthalte eine Vielfalt von verschiedenen, mehr oder weniger kollagenähnlichen Molekülen. KALANT et al. (1977) gelangen ebenfalls die Auftrennung der GBM in mindestens sieben Untereinheiten, die wechselnde Mengen an OH-Prolin enthielten. Inwieweit es sich bei all diesen isolierten Fraktionen nicht um Kunstprodukte der Aufarbeitung handelt, bleibt noch offen.

II. Pathologische Veränderungen kollagenhaltiger Gewebe beim Diabetes mellitus

Wie bereits einleitend erwähnt, stellt die diabetische Glomerulosklerose eine pathologische Veränderung der GBM sowohl in quantitativem wie auch qualitativem Sinne dar. Zunächst sei jedoch auf extrarenale Veränderungen beim DM unter besonderer Berücksichtigung kollagenhaltiger Körpergewebe eingegangen.

1. Extrarenale Veränderungen

Die mit Basalmembranenverbreiterung und Mucopolysaccharidablagerungen verbundene diabetische Mikroangiopathie bleibt bekanntlich nicht auf den Bereich der Niere beschränkt, sondern manifestiert sich ebenfalls an den Kapillaren und Arteriolen der Haut, Muskulatur, Rektalschleimhaut und der Netzhaut. Allerdings sind diese Ver-

änderungen nur in begrenztem Umfang für den DM pathognomisch. Einige Autoren sehen diese nicht als Folge der metabolischen Störung an, sondern als mit dem DM gemeinsame genetische Disposition (SIPERSTEIN et al. 1968), was jedoch im Widerspruch zu vielen anderen Ergebnissen steht, die für die metabolische Hypothese sprechen.

Bei der sogenannten diabetischen Neuropathie findet man elektronenoptisch krankhafte Veränderungen an den Nerven der degenerierten Muskelgruppen, wobei als wesentliche pathologische Veränderung eine Verdickung der die Schwann'schen Scheidenzellen umhüllenden Basalmembran auftritt (BISCHOFF 1968).

Die oft als diabetische Makroangiopathie bezeichnete vermehrte Arteriosklerose bei DM stellt histochemisch unter anderem ein gehäuftes Auftreten faserartiger, gerichteter saurer Mucopolysaccharide dar (RANDERATH und DIEZEL, 1959). 40-60% des Proteins der arteriosklerotischen Plaques bestehen aus Kollagen. Die Aktivität der Prolinhydroxylase ist bei experimentell induzierter Arteriosklerose erhöht (s. zus.fassend KIVIRIKKO und RISTELI 1976), ebenso der Gehalt an löslichem Kollagen und der Einbau markierten Prolins. Erwähnenswert ist ebenso die große elektronenoptische Ähnlichkeit der Kollagen-produzierenden Zellen mit Fibroblasten (MC CULLAGH und BALIAN 1975). Die Pathogenese der Arteriosklerose steht damit in engem Zusammenhang mit dem Bindegewebsstoffwechsel.

Einige Erkrankungen des Stützgewebes kommen bei DM ebenfalls gehäuft vor. So findet man die Dupuytren'sche Erkrankung sowie Verhärtungen des subkutanen Gewebes der Hände (Stiff-hands-Syndrom) bei zuckerkranken Personen 3-10 mal häufiger als bei Nichtdiabetikern. Statistisch gesehen beobachtet man auch oft Osteopathien in Form der Hyperostosis frontalis interna am Schädel oder als Spondylosis hyperostatica an der Brustwirbelsäule bei Diabetikern.

Auch an der Haut sieht man Veränderungen, die in unterschiedlich engem Zusammenhang zur Zuckerkrankheit stehen. Bemerkenswert

ist, daß insbesondere die persistierende, chronische Form der Sklerodermie in der Mehrzahl der Fälle mit DM vergesellschaftet ist. Dabei finden sich eine stark verdickte Epidermis und vergrößerte Kollagenbündel, interessanterweise jedoch kein Anstieg der Fibroblastenzahl. Die Löslichkeit des Hautkollagens in Neutralsalzlösung ist erhöht, gleichzeitig sind die Prolinhydroxylaseaktivität in vitro sowie die OH-Prolinausscheidung gesteigert (UITTO, 1971). Bei der Necrobiosis lipoidica "diabeticorum" handelt es sich um eine focale Degeneration des Kollagens (MÜLLER und WINKELMANN, 1966), die jedoch wahrscheinlich mehr eine trophische Störung als Folge der gestörten Durchblutung darstellt. Schließlich sei als Erkrankung eines Hautanhangsgebildes die positive Korrelation der Häufigkeit der Paradontose mit der des DM erwähnt.

2. Die Glomeruläre Basalmembran beim Diabetes mellitus

Die ersten klinisch faßbaren Symptome der Glomerulosklerose äußern sich im allgemeinen zwischen 5 und 10 Jahren nach Entdeckung des DM in einer leichten bis mäßigen Proteinurie. Im späteren Verlauf der Erkrankung kann sich eine Niereninsuffizienz einerseits oder ein nephrotisches Syndrom andererseits entwickeln.

Nadelbioptische Untersuchungen beweisen, daß die Veränderungen an der Niere jedoch weit früher einsetzen. Sie beginnen mit einer Vergrößerung der Glomeruli, Erhöhung der Filtrationsfläche und des Filtrationsvolumens (ØSTERBY und GUNDERSON, 1975). Beim Menschen läßt sich die Verbreiterung der GBM etwa nach zwei Jahren feststellen, später auch eine Zunahme des Mesangiumvolumens (ØSTERBY 1972). Im weiteren Verlauf sind zunehmend verödete Glomeruli und auch Immunglobuline im Mesangium nachzuweisen. Funktionszustand und Morphologie der Glomeruli sind also stark von der Manifestationsdauer des DM abhängig, die Progredienz der Erkrankung richtet sich nach der Einstellung der diabetischen Stoffwechsel-

lage, was auch experimentell bewiesen wurde (FOX et al. 1977, MOGENSEN 1976).

Eine Veränderung der Glomeruli im Sinne einer diffusen GS tritt nicht nur bei DM, sondern auch als physiologischer Alterungsvorgang auf. Beim Menschen findet man im Alter stets eine BM-Verbreiterung, vergrößerte Glomeruli und mitunter eine leichte Proteinurie. Auch im Tierversuch konnte eine Dickenzunahme der BM um 100% von Geburt bis zur Reife und weiteren 90% bis ins Alter nachgewiesen werden (Mc NELLY und DITTMER 1976). BOLTON et al. (1976) fanden spontan auftretende fokale GS bei Ratten, HOYER und SPIRO (1978) konnten ebenfalls signifikante biochemische Veränderungen der GBM im Alter feststellen, KALANT et al. (1977) ermittelten eine Zunahme des OH-Prolin-Gehaltes.

Dagegen kann bei diabetischer GS keine solch eindeutige biochemische Veränderung nachgewiesen werden. Schwierige Aufbereitung und unterschiedliche Isolierungsmethoden führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einige Autoren fanden die Aminosäuren und Glykosidzusammensetzung unverändert (KEFALIDES 1973, LAZAROW und SPEIDEL 1964, KIVIRIKKO 1976, WESTBERG 1972). Insbesondere der Arbeitskreis um SPIRO ermittelte dagegen einen erhöhten OH-Lys-, Glucose- und Galactose-Anteil der GBM und einen erniedrigten Lysingehalt (siehe SPIRO 1976, auch KHALIFA und COHEN 1975). In Übereinstimmung damit konnte die gleiche Arbeitsgruppe eine Erhöhung der Lysil-hydroxylase-Aktivität in vitro nachweisen. GRANT et al. (1976) beschreiben eine Erhöhung der OH-Lys- und OH-Pro-Synthese um 100% in vitro bei gleichbleibendem Eiweißumsatz.

Die kausale Pathogenese der diabetischen GS scheint weitgehend geklärt, seit mehrere Autoren eine Rückbildung der pathologischen Veränderungen nach Pankreastransplantationen beobachten konnten. Auch an Nierentransplantaten bei Diabetikern wurde die alleinige Abhängigkeit der Ausbildung der GS von der Stoffwechselführung der Empfänger nachgewiesen (s. zus. fassend ROMEN 1976). Der Nachweis der Reversibilität und die Abhängigkeit des Schweregrades der diabetischen

GS von der Stoffwechselführung ist wohl für die metabolische Hypothese beweisend.

Die formale Pathogenese ist dagegen noch weitgehend strittig. Prinzipiell kann, wie bereits einleitend erwähnt, neben der gesteigerten Synthese von BM-Material auch der gestörte Abbau zur Erklärung der BM-Verbreiterung herangezogen werden. Dazu sind neben biochemischen Strukturanalysen der GBM, Aktivitätsmessungen an auf- und abbauenden Enzymen und Synthesemessungen in vitro auch Markierungsversuche durch Tracergabe in vivo geeignet, auf die im nächsten Kapitel eingegangen werden soll.

III. Theoretische Überlegungen zu Umsatzbestimmungen von Geweben durch Tracergabe

1. Weg des injizierten Tracers im Organismus

Nach Injektion einer Tracersubstanz (in unserem Fall ^{3}H-Prolin) in die freie Bauchhöhle wird diese über den venösen Schenkel der Peritonealkapillaren in die Pfortader aufgenommen. Die Substanz vermischt sich sofort mit der inaktiven Prolinmenge in Blut und Extrazellulärraum sowie mit dem freien Prolin des gesamten Körperwassers, da davon ausgegangen wird, daß die Aminosäuren praktisch ungehindert in den Intrazellulärraum übertreten. Dies bedingt einen sehr raschen Abfall der spez. Aktivität des Tracers im Serum. Der sich daran anschließende weitere langsame Abfall kommt durch den Einbau des ^{3}H-Prolins in alle Proteinfraktionen des Körpers zustande. Je nach Umsatzrate der entsprechenden Proteine wird das markierte Prolin wieder freigesetzt und steht zur Wiederverwendung bereit (Abb. B 3). Dadurch wird der Spiegel der freien ^{3}H-Prolinaktivität verglichen mit umsatzmäßig trägen Geweben lange relativ hoch gehalten.

Das bei der Kollagensynthese hydroxylierte Prolin kann nicht wiederverwendet werden und wird zu Stickstoff und Kohlendioxid abgebaut.

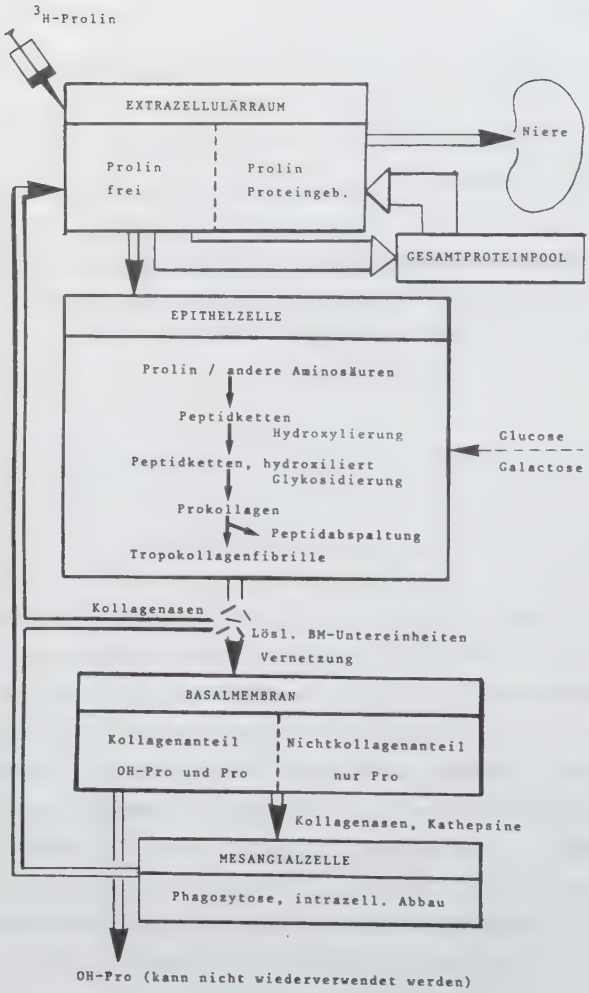


Abb. B 3 : Weg des injizierten Tracers im Organismus

Dessen Ausscheidung im Urin kann in gewissem Umfang als Maß für den Kollagenumsatz des Körpers gelten.

2. Termini technici zu Umsatzbestimmungen

Zunächst seien einige Begriffe definiert, die zur Berechnung von Umsatzparametern verwendet werden.

Unter der Neubildungsrate (NR) eines Gewebes, einer Struktur oder eines Proteinpools (hier: Kollagen) versteht man diejenige Menge des Kollagens in g oder mol, die in einer Zeiteinheit (s) neusynthetisiert und zur bereits bestehenden Menge M an "fertigem" Kollagen hinzugefügt wird. Den entsprechenden Begriff des Abbaus stellt die Abbaurate (AR) (ebenfalls z.B. in g/s) dar.

Bei steady state-Bedingungen sind beide Größen, Einbau- und Abbaurate, gleich. Es ist üblich, diese dann mit dem Oberbegriff Turnover-Rate (TR), deutsch am besten wohl Durchsatzrate, zu bezeichnen.

Für steady state : $AR = TR = NR$

Für Ungleichgewichtsbedingungen ist TR nicht definiert, in der Literatur wird der Begriff jedoch meist mit der AR verknüpft.

Die mittlere Lebensdauer (ML) eines Teilchens in einer Menge (engl. Turnover time) errechnet sich aus der Gesamtmenge (M) dividiert durch die Abbaurate (bei steady state)

$$ML = \frac{M}{AR} \quad \text{in (s)}$$

Unter der Halbwertszeit (HWZ) einer Struktur versteht man den Zeitraum, in dem die Hälfte aller die Struktur bildenden Grundeinheiten umgesetzt, d.h. "erneuert" oder ersetzt wurde. Sie ist mit der ML über die Formel

$$HWZ = ML \cdot \ln 2 = ML \cdot 0,693 \text{ (s)}$$

verknüpft.

3. In vivo Kinetik eines Proteinpools nach Tracergabe

In Abb. B 4 sind die Verhältnisse schematisch dargestellt, die sich nach Tracer-gabe in den verschiedenen Proteinpools des Körpers ergeben.

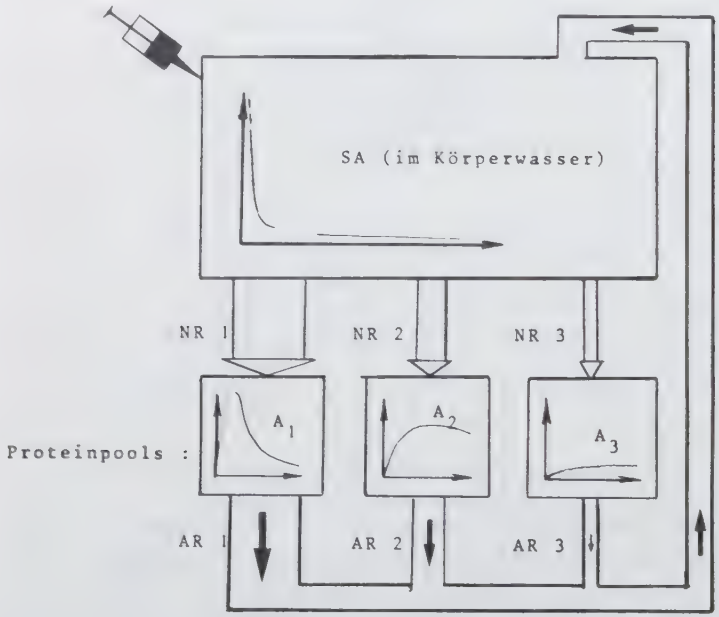


Abb. B 4 : Zur Berechnung der spez. Akt. in den Proteinpools

Ohne steady state Bedingungen vorauszusetzen, gilt für die Aktivität A (t) eines beliebigen Pools zum Zeitpunkt t

$$(1) \quad A(t) = A_o + \int \frac{dA}{dt}\, dt \quad (z.B.\ in\ Ci)$$

mit A_o = Aktivität zur Zeit t = 0 (Ci)

$$\frac{dA}{dt} = \dot{A} = \dot{A}_{ein} - \dot{A}_{aus} \quad (Ci/s)$$

(2) $\dot{A}_{ein} = NR \cdot SA(t)$

mit NR : Neusyntheserate in mol/s

SA : spez. Akt. des freien Prolins im Serum in Ci/mol

(3) $\dot{A}_{aus} = AR \cdot \frac{A}{M} = AR \cdot A_{sp} = \frac{A}{ML} = \frac{A}{HWZ} \cdot \ln 2$

mit AR : Abbaurate in mol/s

A/M : spez. Akt. des Pools in Ci/mol

(2) und (3) in (1) :

(4) $$\boxed{\frac{dA}{dt} = NR \cdot SA(t) - \frac{A}{HWZ} \cdot \ln 2}$$

Diese Gleichung stellt eine inhomogene, lineare Dgl. erster Ordnung dar. Ihre Lösung lautet (nach BRONSTEIN 1971)

(5) $$A = e^{\frac{\ln 2}{HWZ} \cdot t} \left(\int NR \cdot SA(t) \cdot e^{\frac{\ln 2}{HWZ} \cdot t} dt + C \right)$$

für NR = konstant, A (0) = 0 :

(6) $$\boxed{A = NR \cdot e^{\frac{\ln 2}{HWZ} \cdot t} \int SA(t) \cdot e^{\frac{\ln 2}{HWZ} \cdot t} dt}$$

Unter Vernachlässigung des Abbaus (sinnvoll für kurze Zeiten und für Strukturen mit langer HWZ) und unter steady state Bedingungen vereinfacht sich die Formel (6) zu

$$A = NR \cdot \int SA(t)\, dt$$

oder mit $NR = AR = \frac{M}{ML}$

$$A_{sp} = \frac{\int SA\,(t)\,dt}{ML} = \frac{\int SA\,(t)\,dt}{HWZ} \cdot \ln 2$$

(7) $$\boxed{HWZ = \frac{\int SA\,(t)\,dt}{A_{sp}} \cdot \ln 2}$$

Diese Formel ist zur Abschätzung der HWZ aus den Synthesebedingungen geeignet und wird auch von NIKLAS et al. (1958) zur Bestimmung der HWZ verschiedener Organe benutzt.

Bei der Berechnung der Abbaugrößen wurde vorausgesetzt, daß der Abbau der Kollagenmoleküle nach statistischen Gesetzen erfolgt, also neusynthetisierte und "ältere" Kollagenmoleküle in gleichem Maße dem Abbau unterliegen. Sollten diese jedoch "altern" (im Sinne einer Erythrozytenalterung) oder der Abbau gerichtet erfolgen, so stellt die zu erwartende Verlaufskurve der spez. Aktivität keinen exponentiellen Abfall (Abb. A 3), sondern eine Treppenkurve dar (Abb. B 5).

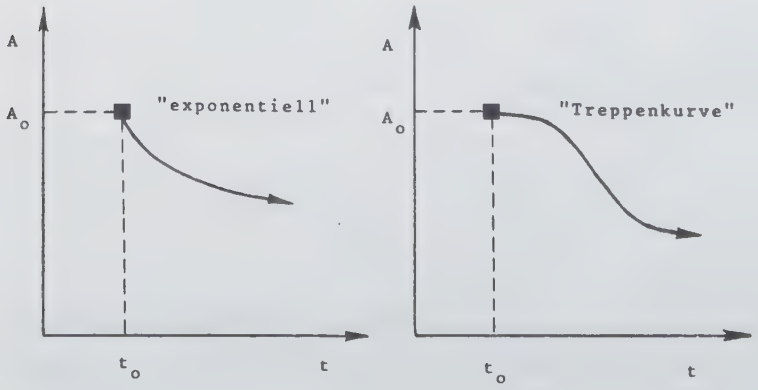


Abb. B 5 : Verlaufskurven der A_{sp}

Die Ergebnisse dieser theoretischen Vorüberlegungen werden in der Diskussion dargestellt.

C. MATERIAL und METHODE

I. Versuchsübersicht und allgemeine Angaben zum verwendeten Material

Alle Versuche wurden an männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt (Fa. WiGa Versuchstierzuchtanstalt, 8741 Sulzfeld). Für die Vorversuche wurden ca. 8 Wochen alte, 200 g schwere Ratten herangezogen. In den Hauptversuchen wurden die Tiere in 3 Versuchsgruppen eingeteilt, die im folgenden kurz charakterisiert werden.

1. "Kontrollen" : 40 unbehandelte Kontrolltiere, Alter ca. 19 Wochen, Gewicht 396 $\pm$ 13 g, Blutzucker 126 $\pm$ 15 mg%
2. "Diabetes" : 40 diabetische Tiere, Alter ca. 19 Wochen, Gewicht 240 $\pm$ 43 g, BZ 402 $\pm$ 44 mg%, seit 9 Wochen manifester, Streptozotocin-induzierter Diabetes mellitus
3. "Alte Tiere" : 40 unbehandelte Ratten, Alter ca. 1,9 Jahre, Gewicht 550 $\pm$ 22,9 g, BZ 127 $\pm$ 13 mg%

In den Vorversuchen wurde der Einfluß mehrerer Parameter auf die Relevanz der Ergebnisse abgeklärt. Insbesondere wurde die Metabolisierung des Injektionspräparates sowie der Verlauf der spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum untersucht.

Der methodische Ablauf der Hauptversuche ist in Abb. C 1 schematisch dargestellt. Das Problem des Kollagenumsatzes in glomerulärer Basalmembran und Schwanzsehne wurde mit einer in vivo - Studie nach Diabetisierung der Ratten mit Streptozotocin angegangen. Die Tiere bekamen ^{3}H-Prolin injiziert. In der Folge wurde mehrfach die spez. Aktivität des freien Prolins im Serum ermittelt. Entweder einen Tag oder drei Wochen nach Markierung wurden die Tiere getötet, die Glomeruli isoliert, die GBM präpariert und daran wie an dem Schwanzsehnenmaterial eine Aminosäurenanalyse zur Bestimmung der spez. Aktivität im Prolin und Hydroxyprolin durchgeführt.

In der Folge wird die Methodik im einzelnen beschrieben.

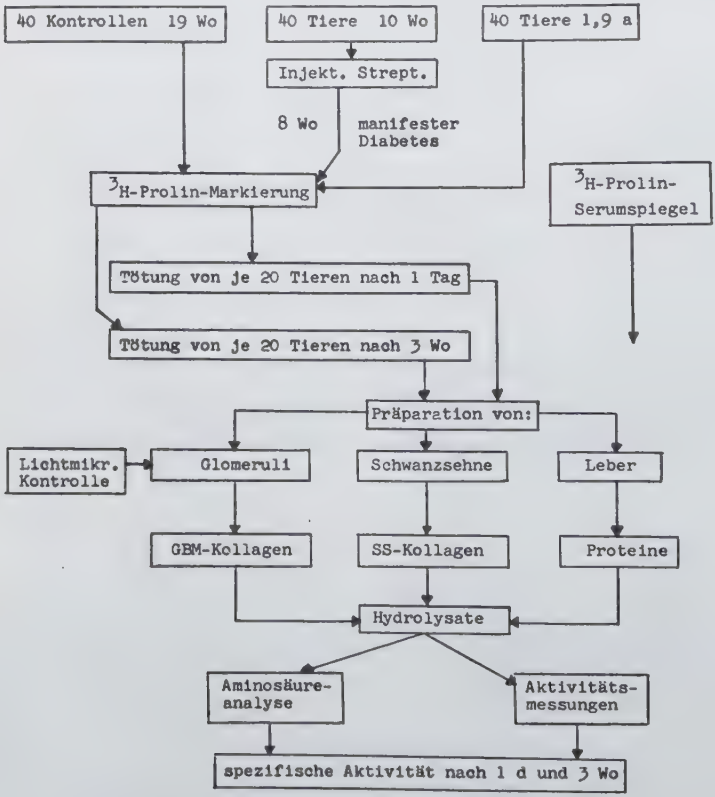


Abb. C 1 : Versuchsübersicht, Hauptversuche

II. Induktion diabetischer Stoffwechsellage mittels Streptozotocin

Zur Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage bei der Versuchsgruppe: "diabetische Tiere" wählten wir das Antibiotikum Streptozotocin. Die Substanz wurde in kristalliner Form von der Firma Boehringer, Mannheim GmbH bezogen. 50 Tiere im Alter von 8 Wochen, Gewicht 180 - 200 g, erhielten eine einmalige intravenöse Injektion unter kurzer Äthernarkose.

Dazu wurde den Ratten eine 3%ige Lösung der o.g. Substanz in Citratpuffer, 0,1 molar, pH 4,5 in die dorsale Schwanzvene injiziert. Die Dosis betrug 65 mg/kg Körpergewicht. Sowohl vor Injektion des Streptozotocins sowie 1 Woche, 2 und 8 Wochen nach Injektion kontrollierten wir den Serumglucose-Wert der Tiere. Hierzu wurden aus dem Orbitalplexus der gefütterten Ratten morgens zwischen 8^{30} und 10^{00} Uhr 100 µl Blut mittels Punktion entnommen, eine Eiweißfällung mit 1,9 ml 3%iger Trichloressigsäure durchgeführt und die Glucose-Werte nach der GOD-POD-Methode bestimmt. Bis zur Injektion des ^{3}H-Prolins wurden weiterhin die metabolischen Daten der Versuchstiere (Körpergewicht, Trinkmenge, Proteinurie und Glucosurie) überwacht. Für die Untersuchungen zum Kollagen-Turnover verwendeten wir nur solche Tiere, die konstante Serumglucose-Werte über 280 mg% entwickelt hatten. Sie wurden auch in der Folge ad libidum getränkt und gefüttert.

III. Prüfung des verwendeten ^{3}H-Prolins auf dessen Eignung als Tracersubstanz

Die Verwendung von markiertem Prolin für Umsatzbestimmungen kollagenhaltiger Gewebe bietet sich, wie in Kap. B.III.1. gezeigt wurde, an. In dieser Arbeit wurde für die Hauptversuche (2)-^{3}H-Prolin[1] be-

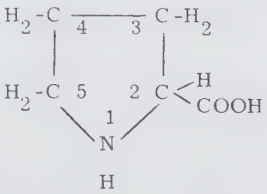
---

1) Herrn Prof. Dr. Dr. K. Hempel, Inst. f. med. Strahlenkunde der Universität Würzburg, möchten wir für die freundliche Überlassung des von ihm selbst synthetisierten ^{3}H-Prolins herzlich danken.

nutzt, das gegenüber ^{14}C-markiertem Prolin theoretische Nachteile aufweist, die in den in der Folge beschriebenen Vorversuchen ausgeschlossen wurden.

1. Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Prolin

Hier wurde die Frage untersucht, ob die Verwendung von ^{3}H-markiertem Prolin zu Aktivitätsverlusten während des Hydroxylierungsvorgangs in den kollagenproduzierenden Zellen führt. Dazu sei zunächst an die chemische Formel des Prolins erinnert:



In diesem Vorversuch wurden verwendet:

1. ^{14}C-Prolin : alle C-Atome ^{14}C markiert
2. (2, 3) ^{3}H-Prolin : H-Atome an Stellung 2 und 3 markiert
3. (2) ^{3}H-Prolin : Nur H-Atome an 2 markiert

Bezugsquellen siehe Tabelle D 1. Das Präparat 3 wurde auch in den Hauptversuchen verwendet. Die Hydroxylierung zu OH-Prolin erfolgt an Stellung 4, in einem geringen %-Satz an Stellung 3.

Es wurden 2 Injektionscocktails hergestellt, die ein Gemisch aus ^{14}C-Prolin und (2, 4) ^{3}H-Prolin bzw. aus ^{14}C-Prolin und (2) ^{3}H-Prolin darstellten. Das Verhältnis der Aktivitäten ist aus Tab. D 1 zu entnehmen. Die Aktivierungsdosis betrug etwa 10 mCi/kg KG ^{3}H-Prolin und etwa 1 mCi/kg KG ^{14}C-Prolin. Von 4 Tieren gleichen Alters (8 Wochen) und Gewicht (200 g) bekamen jeweils 2 die oben beschriebenen Gemische i.p. gespritzt. Nach 1 Tag wurden die Tiere getötet, Leber und Schwanzsehnen entnommen und wie üblich biochemisch aufgearbeitet und gemessen.

2. Säurehydrolyse eines Gemisches aus ^{14}C- und ^{3}H-Prolin

Dazu stellten wir zwei Gemische aus ^{14}C- und ^{3}H-Prolin her, deren Zusammensetzung aus Tab. D 1 zu entnehmen ist. Die ^{14}C- und ^{3}H-Prolinaktivität wurde zunächst direkt, d.h. ohne weitere Behandlung gemessen. Danach wurden die beiden Gemische einer Säurehydrolyse entsprechend der späteren Proteinhydrolyse unterzogen und erneut auf ^{14}C- und ^{3}H-Aktivität untersucht.

3. Verwendung von Injektionsgemischen unterschiedlicher spezifischer Aktivität

Um die Frage zu klären, inwieweit die Prolinresorption und -metabolisierung vom Gehalt des inaktiven Prolins und damit der spezifischen Aktivität des Injektionspräparates abhängt, gingen wir wie folgt vor: Jeweils 2 Ratten gleichen Alters und Gewichts (19 Wochen, Gew. ca. 380 g) erhielten 3 verschiedene Injektionspräparate i.p. injiziert, die die gleiche ^{3}H-Prolin-Aktivität, jedoch unterschiedliche Mengen an inaktivem Prolin enthielten (Aktivitätsdosis ca. 10 mCi/kg KG, Prolindosis siehe Tab. D 4). Weiterhin bekamen 2 Ratten ein Injektionspräparat, das in alkoholischer Lösung mit stark basischem pH vorlag. Alle anderen Injektionspräparate waren wässerige Prolinlösungen mit neutralem pH. Die Tiere wurden in allen anderen Punkten wie in den Hauptversuchen behandelt und nach 1 Tag getötet. Wir entnahmen dann die Schwanzsehnen und untersuchten die A_{sp} des Gesamtproteinhydrolysats.

IV. Überprüfung des Verlaufs der spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum

Der für die Frage des Einbaus entscheidende Verlauf der spez. Aktivität des freien Prolins im Serum wurde parallel zu jeder Versuchsgruppe vor Beginn des eigentlichen Hauptversuchs durchgeführt. Jeweils 4 Ratten der 3 Versuchsgruppen (Kontrollen, Diabetes, Alte Tiere), erhielten - wie weiter unten beschrieben - 10 mCi/kg KG ^{3}H-Prolin i.p. injiziert. Nach 5, 10, 15, 25, 40 und 60 min, nach 2 und 4 Std. sowie nach einem Tag entnahmen wir den Tieren 50 µl Blut durch Punktion des Orbitalplexus.

Aufgrund der häufigen Blutentnahmen während der ersten 2 Stunden wurden diese bis zu diesem Zeitpunkt in Ketaminnarkose vorgenommen (Ketanest^{R} i.m., Dosis ca. 0,5 ml/100 g KG = 25 mg/100 g). Für die späteren Versuchspunkte zogen wir eine kurze oberflächliche Äthernarkose vor. Das Blut wurde in heparinisierten Kapillarröhrchen zentrifugiert und das Serum (ca. 25 µl) einer Eiweißfällung mit 100 µl 6%iger TCA unterzogen.

Nach Zentrifugation wurden die Serumproteine verworfen, vom Überstand (= säurelösliche Fraktion: SLF) ein aliquod entnommen und durch Abdampfen auf Filterpapier das Tritium-Wasser entfernt. Die Schnitzel des etwa 4 cm^{2} großen Filterpapiers wurden in 2 ml Aqua bidest. eingebracht, mit 15 ml Triton-Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler (Tricarb, Fa. Packard) gemessen, die so ermittelte Aktivität der Proben in (nCi) umgerechnet und auf einen µl Serum bezogen.

Die Angabe der A_{sp} in (nCi/µmol) ergibt sich aus der in weiteren Versuchen gefundenen Prolinmenge in einem µl (123,4 nmol/ml Serum).

Beispiel: Die A_{sp} des freien Prolins im Serum sei 10 nCi/ul Serum. Dies entspricht

$$\frac{10}{0,1234}\left(\frac{nCi \cdot \mu l}{\mu l \cdot nmol}\right) = 81,03\left(\frac{nCi}{nmol\ Prolin}\right)$$

Die oben beschriebene SLF setzt sich aus einem Prolinanteil und einer weiteren ^{3}H-markierten nichtflüchtigen Fraktion (= NFF) zusammen, die im wesentlichen aus Prolinmetaboliten besteht. Um das Verhältnis Prolin/NFF in der SLF zu bestimmen, wurde jeweils weiteren 4 Tieren jeder Versuchsgruppe nach 10 min, 25 min, 1 Std, 4 Std, 1 Tag, 1 Wo, 2 Wo und 3 Wochen nach Aktivierung 100 µl Blut entnommen wie oben beschrieben. Die von 4 verschiedenen Tieren stammenden Proben wurden einzeln bis zur SLF verarbeitet, dann gemischt und auf den Beckman-Aminosäure-Analysator aufgetragen. Eine vorausgegangene Analyse der interindividuellen Variabilität an 4 Tieren einer Versuchsgruppe ergab sehr geringe Schwankungen, was dieses erleichterte Vorgehen zulässig macht. Aus diesen Untersuchungen bestimmten wir sowohl das Verhältnis Prolin/NFF kurz nach Aktivierung sowie die Absolutwerte für die Aktivität nach längeren Zeiten.

Zusätzlich wurde während der Hauptversuche an den Tötungsterminen (1 Tag und 3 Wochen) eine größere Menge Blut durch Herzpunktion entnommen, eine säurelösliche Fraktion hergestellt und eine Aktivitätsanalyse mit Hilfe des Beckman-Aminosäure-Analysators durchgeführt.

V. Markierung der Versuchsgruppen, Tötung, Entnahme der untersuchten Strukturen

Die letzte Fütterung der Ratten lag jeweils 12 Stunden vor Versuchsbeginn. Im weiteren Verlauf erhielten die Tiere 30 Minuten nach Markierung bis zum Tötungszeitpunkt Futter und Wasser ad libidum; die Raumtemperatur betrug 23^{o}C.

Die Markierung der Versuchstiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 1-2 ml einer isotonischen NaCl-Lösung (2) ^{3}H-markierten Prolins in einer Dosis von etwa 10 mCi/kg KG. Die spezifische Aktivität des Präparates betrug 5, 3 Ci/mmol.

Von jeder Versuchsgruppe wurden jeweils 20 Tiere einen Tag und 3 Wochen nach Injektion des ^{3}H-Prolins getötet.
Zuvor gewannen wir durch Herzpunktion unter Äthernarkose ca. 2 ml Blut. Darauf wurden die Nieren, ein Leberlappen, ein etwa 4 cm^2 großes Stück Bauchhaut sowie Ohrknorpel entnommen und sofort bei -25^{o}C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Zur Präparation der Schwanzsehnen wurde der Schwanz an der Haargrenze abgetrennt, die Schwanzhaut abgezogen und das haftende Blut kurz abgewaschen. Nach dem Durchbrechen einzelner Schwanzwirbel konnten die Sehnenbündel leicht aus der Sehnenscheide gezogen und sofort in Äther zur Entfettung und Trocknung gegeben werden. Nach etwa 2 Std. wurde der Äther dekantiert, die Proben getrocknet und bei -30^{o}C eingefroren.

VI. Präparation der untersuchten Strukturen

1. Isolierung der Glomeruli

Bei der Präparation der glomerulären Basalmembran (GBM) folgten wir im wesentlichen der Arbeitsvorschrift von STEIGERWALD (1979), die eine Variante der Methode von KRAKOVER und GREENSPON (1951) darstellt. Die aufgetauten Nieren wurden von Fett und Kapsel befreit, der Länge nach halbiert und Kelche, Papillen und Gefäßhilus herausgeschnitten. Alle weiteren Arbeiten erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, im Eisbad oder auf Eis. Die halbierten Nieren wurden nun in kleine Würfel gehackt und mit Hilfe eines kleinen Glasbechers durch ein Stahlsieb definierter Porenweite (s.u.) durchpassiert, wobei die Siebauflagerung mehrmals mit ca. 20 ml isotoner Kochsalzlösung aufgeschwemmt wurde. Die Siebauflagerung wurde verworfen, das entstandene Nierenhomogenat auf Eis gerührt und dann durch zwei Nylonnetze kleinerer Porenweite (s.u.) gegossen. Die Netzauflagerungen wurden mehrfach aufgeschwemmt und mit insgesamt 2 Litern isotonischer NaCl-Lösung gespült.

Aufgrund der stark unterschiedlichen Größe der Glomeruli, die bei den einzelnen Versuchsgruppen beobachtet wurden, haben wir für Stahlsieb und Nylonnetze unterschiedliche Porenweiten gewählt. Sie sind aus Tab. C 1 zu entnehmen.

Versuchsgruppe	Porenweiten		
	Stahlsieb	oberes Nylonnetz	unteres Nylonnetz
1 : Kontrollen	80 µm	80 µm	48 µm
2 : Diabetes	80 µm	80 µm	48 µm
3 : Alte Tiere	100 µm	80 µm	--

Tab. C 1: Porenweiten der verwendeten Siebe

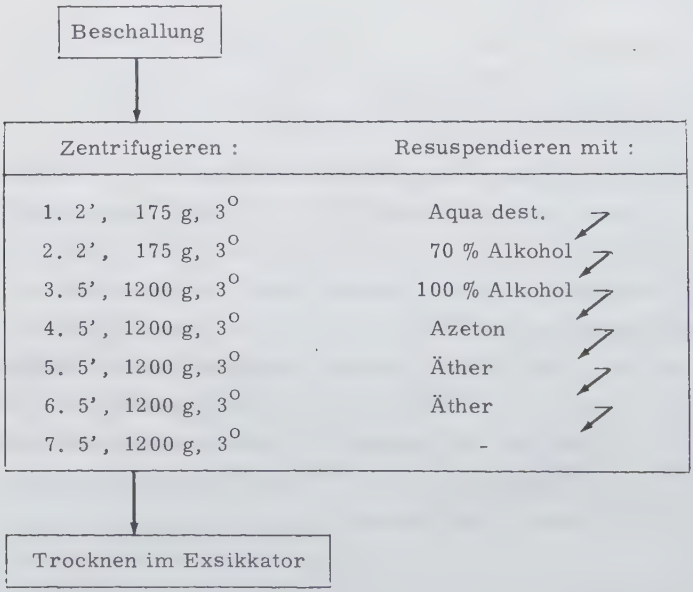
Bei den Versuchsgruppen 1 und 2 fanden sich auf dem 48 µm Nylonnetz überwiegend Glomeruli, bei Versuchsgruppe 3 auf dem 80 µm Nylonnetz. Diese Fraktionen wurden weiter untersucht, ebenso alle 80 µm Nylonnetzauflagerungen als Kontrolle.

Die Auflagerungen wurden in etwa 100 ml isotonischer NaCl-Lösung abgewaschen und dann 15 Minuten mit 510 g bei 3°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Glomeruli erneut suspendiert, das Volumen auf 50 ml eingestellt, davon 15 mal 20 µl mit der Eppendorfpipette entnommen und nach Lufttrocknung eine H-E - Färbung der auf 5 Objektträger aufgetropften Suspension durchgeführt. Ebenso kontrollierten wir die übrigen Fraktionen (Stahlsieb-, 80 µm Nylonnetzauflagerung, Spülflüssigkeit). Hierauf erfolgte erneut Zentrifugation 15 Minuten mit 510 g bei 3°C und Resuspension in etwa 12 ml isotonischer Kochsalzlösung.

2. Präparation der glomerulären Basalmembran

Die Glomerulussuspension wurde in ein Beschallungsgefäß gegeben, das im Eisbad stand. Die Ultraschallbehandlung wurde an einem Gerät der Firma MSE Ltd., London, England, Typ 100 20 mal für jeweils eine Minute durchgeführt. Die dazwischen liegenden Pausen von jeweils einer halben Minute dienten zur Abkühlung der Probe.

Das beschallte Material wurde darauf 2 mal 2 Minuten bei 175 g und 3^{O} C zentrifugiert, um die entstandenen Zellfragmente von der Basalmembranfraktion höherer Dichte zu trennen. Anschließend wurde die Kochsalzlösung durch Extraktion mit einer Alkohol-Aceton-Äther-Reihe entfernt, und das so entstandene Basalmembranmaterial im Exsikkator für 24 Std. getrocknet. Die sich an die Beschallung anschließende Durchführung der Zentrifugation zeigt das nachfolgende Schema.



3. Präparation des Schwanzsehnenkollagens

Die den Ratten entnommenen Schwanzsehnen lagen, wie oben beschrieben, in entfetteter und getrockneter Form vor. Zur Vorbereitung für die anschließende Hydrolyse war lediglich eine Zerkleinerung der Fäden mit der Schere und ein Lösen der verklebten Strukturen notwendig.

4. Präparation der Leberproteine

Die nach Entnahme tiefgefrorenen Lebern der Tiere wurden aufgetaut, von jeder Leber ein aliquod entnommen, gemischt und mit dem Messer zerkleinert. Von diesem Gemisch verarbeiteten wir jeweils ein Gramm weiter, indem wir es mit dem Mörser zerrieben und mit 80 ml 0,95 %iger NaCl-Lösung nachspülten. Darauf erfolgte eine Homogenierung des Gemisches im "Potter" und Zugabe von weiteren 80 ml isotoner Kochsalzlösung (alle Arbeiten im Eisbad). Darauf wurde eine Eiweißfällung mit 20 ml 100 %iger Trichloressigsäure unter 5 Minuten Rühren durchgeführt. Die Proben wurden 5' bei 230 g, 4 ^{o}C zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Zentrifugat mit 80 ml NaCl und 20 ml 100 %iger TCA resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Die nachfolgende Behandlung, die im wesentlichen der Entfettung und Trocknung diente, ist im Kapitel C.VI.2. im Schema dargestellt.

Die anschließende Lufttrocknung ergab etwa 200 mg einer weißlich grauen, pulvrigen Trockensubstanz.

VII. Aktivitätsmessungen, Aminosäurenanalyse und biochemische Untersuchungen

Alle untersuchten Proteinfraktionen wurden vor der biochemischen Weiterverarbeitung 24 Std. im Exsikkator getrocknet. Leber- und GBM-Substanz lagen in Pulverform vor, die Sehnen als kleingeschnittene Fäden.

Von der Trockensubstanz wurde eine definierte Menge (zwischen 3 und 70 mg) eingewogen und mit 5 bis 15 ml 6n HCl 24 Std. bei 110°C hydrolysiert. Darauf wurde das Hydrolysat gefiltert, die Salzsäure durch zweimaliges Abdampfen entfernt und in 3 bis 10 ml Aqua bidest aufgenommen. In dieser Form (pH der Lösung: 1) wurden die Proben bei +4°C bis zur Aminosäuren- und Aktivitätsanalyse aufbewahrt.

Beide Messungen wurden mit einem Beckman-Unichrom-Aminosäuren-Analysator durchgeführt. Die Trennsäule war mit Anionenaustauscherharz M 72 (Fa. Beckman Instruments) gefüllt, die Säulentemperatur betrug 55°C, die Säulenlänge 58 cm, die Durchflußgeschwindigkeit des Puffers 60 ml/Std. Als Puffer verwendeten wir Natriumcitratpuffer (pH 2, 79; 0, 2 n).

Zur Erstellung der Gesamtaminosäurenanalyse waren mehrere Säulenläufe erforderlich:

a) Zur Abtrennung des OH-Prolins von der Asparaginsäure:
   Säulenprogramm wie oben beschrieben
b) Für die sauren und neutralen Aminosäuren:
   Harz M 72, Säulenlänge 58 cm, Säulentemperatur 55°C, Puffer Na-Citrat pH 3, 27/0, 2 m bis 80 min, pH 4, 25/0, 2 m bis Ende
c) Für die basischen Aminosäuren:
   Harz M 82, Säulenlänge 21 cm, Säulentemperatur 55°C, Puffer Na-Citrat pH 5, 28/0, 35 m bis 76 min, pH 6, 92/0, 85 m bis Ende.

Für die Aminosäurenanalyse wurden die aufgetrennten Aminosäuren mit Ninhydrin angefärbt und im Photometer gemessen, für die Aktivitätsanalyse in Becher zu je 2 ml (pro 2 min) fraktioniert. Dazu ga-

ben wir 15 ml Szintillationsmedium "Triton" folgender Zusammensetzung:

Ansatz "Triton" : 120 g PPO (2, 5 Diphenyloxazol) MG 221, 6
3 g PoPoP (1, 4-Bis (5-Phenyloxazolyl))
in : 5 l Triton
10 l Toluol
7, 5 l Isopropanol

Die in 2-minütigem Abstand fraktionierten Proben wurden im Tricarb Szintillationszähler (Packard) gemessen.

Für Proben niedrigerer Aktivität verwendeten wir das Szintillationsgemisch Insta-Gel der Fa. Packard.

VIII. Auswertung und allgemeines Berechnungsschema

Zur Bestimmung der in einem aliquod eines Proteinhydrolysats vorhandenen Menge an Aminosäuren wurde wie folgt vorgegangen:

Der Aminosäurenanalysator liefert einen Ausdruck, in dem die Peaks der Extinktion der jeweiligen mit Ninhydrin angefärbten Aminosäure entsprechen. Die Fläche unter diesen Peaks wurde mit Hilfe der Halbwertsbreitenmethode per Handauswertung bestimmt. Diese Flächen wurden mit denen verglichen, die zuvor aus dem Standard, d.h. einem Aminosäurengemisch bekannter Mengen, resultierten. Das Ergebnis stellte den Gehalt (M) der Probe an den interessierenden Aminosäuren in (µmol/ml Hydrolysat) dar.

Das gleiche Hydrolysat wurde wie oben beschrieben in definierter Menge auf die Trennsäule gegeben und in fraktionierter Form die Aktivität (A) gemessen. Die über den Aminosäurepeaks liegenden counts wurden integriert, über einen ^{3}H-Standard bekannter Zerfallsrate in Zerfälle pro Minute umgerechnet und schließlich in (nCi/ml) angegeben.

Die spezifische Aktivität (A_{sp}) errechnet sich mit

$$A_{sp} = \frac{A}{M} \quad (nCi/\mu mol)$$ mit A : Aktivität in (nCi/ml)
M : Menge in (μmol/ml)

Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, muß die A_{sp} stets auf die gleiche individuelle Markierungsdosis eines Tieres bzw. auf die durchschnittliche Markierung einer Versuchsgruppe bezogen werden. Die Markierungsdosis definierten wir als injizierte ^{3}H-Prolin Aktivität, bezogen auf das Körperwasser der Tiere. Das Körpergewicht differierte bei den einzelnen von uns untersuchten Versuchsgruppen erheblich, wie aus Tab. C 2 ersichtlich. Da nach ALTMAN und DITTMER (1974) der Anteil des relativ stoffwechselinaktiven Fettgewebes mit dem Körpergewicht ansteigt, die "lean body mass" dabei jedoch etwa konstant bleibt, zogen wir es vor, die injizierte Dosis auf das Körperwasser zu beziehen.

Gewichtsklasse	Gewicht (g)	Körperwasser/Gewicht A_{KW} (l/kg)
8 Wo. alte und diab. Tiere	226 ± 38	0,7
Kontrolltiere	395 ± 11	0,65
Alte Tiere	545 ± 26	0,56

Tab. C 2 : Abhängigkeit des Anteils des Körperwassers am Körpergewicht (nach ALTMAN und DITTMER (1974)

Dabei gilt:

$$D_{KW} = \frac{D_{KG}}{A_{KW}}$$ mit D_{KW} : Akt. dosis bez. auf Kö-wasser in (mCi/l)
D_{KG} : Akt. dosis bez. auf Kö-gewicht in (mCi/kg)
A_{KW} : Anteil des Körperwassers am Gesamtgewicht in (l/kg)

Wir teilten die von uns untersuchten Tiere in drei Gewichtsklassen ein (Tab. C 2) und errechneten die normierte spez. Aktivität ($A_{sp,n}$) wie folgt

$$A_{sp,n} = \frac{A_{sp}}{D_{KG}} \cdot A_{KW} \quad (nCi/\mu mol \;//\; mCi/l\ KW)$$

Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sind so dargestellt, als ob das Tier oder die Versuchsgruppe eine Markierungsdosis von 10 mCi/l KW erhalten hätte.

In einigen Vorversuchen war die Auftrennung des Hydrolysats zu aufwendig. Die im Hydrolysat gemessene (Gesamt)-Aktivität wurde dann auf die eingewogene Menge an Protein bezogen. Diese "proteinspezifische" Aktivität ergab sich dann zu:

$$A_{sp\ Prot.} = \frac{A_{ges}}{M_{Prot.}}$$

mit: $A_{sp\ Prot.}$: "Proteinspezifische" Akt. in (nCi/mg)

A_{ges} : Ges. akt. des Hydrolysats in (nCi/ml)

$M_{Prot.}$: Eingewogene Proteinmenge in (mg/ml)

Die Normierung erfolgte auf gleiche Weise wie oben.

D. ERGEBNISSE

I. Ergebnisse der VORVERSUCHE

1. Konstanz des verwendeten ^{3}H-Prolin Tracers gegenüber Säurehydrolyse

Das von uns in den Hauptversuchen als Tracersubstanz verwendete ^{3}H-Prolin beinhaltet die Möglichkeit eines Austauschs von Wasserstoffionen während der für die Aufbereitung unumgänglichen Säurehydrolyse und damit die Gefahr eines Aktivitätsverlusts. Eine sichere Bestimmung der Aktivität der Proben wäre somit nicht möglich. Tab. D 1 zeigt die spezifische ^{14}C- und ^{3}H-Aktivität der beiden Vergleichspräparate I und II jeweils vor und nach Säurehydrolyse (Methodik siehe Kap. C. III. 2.). Die spezifische Aktivität des ^{14}C-Prolins bleibt in beiden Präparaten während der Säurehydrolyse gleich. Die errechneten Unterschiede (0, 4 und 2, 4 %) liegen im Bereich der Meßgenauigkeit.

Die spezifische Aktivität des ^{3}H-Prolins ist beim gekauften Präparat ebenfalls gleich, beim eigensynthetisierten noch 86 % des Ausgangswertes. Die etwas größere Empfindlichkeit des letztgenannten Präparates wurde in den Hauptversuchen in Kauf genommen, da der sich ergebende Fehler für alle Ergebnisse gleich bleibt. Bei allen anderen Schritten zur Aufbereitung der Proben besteht nicht die Gefahr eines Aktivitätsverlusts.

2. Ausschluß von Fehlinjektionen

Aufgrund der teilweise sehr geringen Probenmengen und relativ aufwendiger Untersuchungstechnik mußten die Proben der Einzeltiere gepoolt werden. Eine eventuelle Fehlinjektion ist dann nicht mehr zu erkennen und führt zu einem zu niedrigen Durchschnittswert. Eine einfache Methode zum Ausschluß von Fehlinjektionen läßt sich aus den Ergebnissen, die in Tab. D 2 und D 3 dargestellt sind, ableiten. Hier sind die Befunde der Lebern, Schwanzsehnenkollagen und Serum von fünf gleichbehandelten Kontrolltieren wiedergegeben. Die spezifische Aktivität der Leber nach einem Tag ist bei Ratte 3 und 5 etwa um den Faktor 30 niedriger als die Werte der übrigen Tiere. Im SSK ist bei den Tieren 3 und 5 keine meßbare Aktivität. Schließlich ist die Anzahl der Totalcounts im Serum dieser Tiere leicht erhöht, die counts der nichtflüchtigen Fraktion (NFF) stark erniedrigt. Bei den Ratten 3 und 5 lagen Fehlinjektionen, entweder subcutan oder ins Darmlumen, vor. Die Bestimmung des Verhältnisses NFF/Gesamtaktivität (Kap. C. IV.) wurde in den Hauptversuchen nach einem Tag durchgeführt und durch diese einfache Methode Fehlinjektionen aus dem zu untersuchenden Pool ausgeschlossen.

	Präp. I	Präp. II	
A_{sp} ^{14}C-Pro (µCi/ml)	26, 2	37, 4	
A_{sp} ^{14}C-Pro nach Hydrolyse (µCi/ml)	26, 4	36, 5	^{14}C
Veränderung (%) durch Hydrolyse	+ 0, 4	- 2, 4	
A_{sp} ^{3}H-Pro (µCi/ml)	624	1078	
A_{sp} ^{3}H-Pro nach Hydrolyse (µCi/ml)	630	928	^{3}H
Veränderung (%) durch Hydrolyse	+ 1	- 14	

Präp. I : Gemisch aus ^{14}C(u)-Prolin und ^{3}H(2, 3)-Prolin beides bezogen von Fa. NEN Radiochemicals, USA

Präp. II : Gemisch aus ^{14}C(u)-Prolin wie Präp. (I) und ^{3}H (1)-Prolin aus Eigensynthese Prof. Hempel

Tab. D 1 : Vergleich der Konstanz der verwendeten Inj. Präp. gegenüber Säurehydrolyse

Ratte, Bez.	Dosis (mCi/kg KG)	A_{sp}, Leber (nCi/mg Prot.)	A_{sp}, SSK (nCi/mg Prot.)
BM 1	4, 8	31, 7	0, 71
BM 2	5, 2	41, 7	0, 71
BM 3	5, 1	0, 7	nicht meßbar
BM 4	5, 1	21, 2	1, 32
BM 5	5, 0	0, 9	nicht meßbar

Tab. D 2 : Spez. Akt. in Leber und Schwanzsehne bei Fehlinjektion und normaler Injektion

Ratte, Bez.	Counts, ges. (cpm/ml SLF)	Counts, NFF (cpm/ml SLF)	NFF/Gesamt (-)
BM 1	258 000	8 000	$3,1 \cdot 10^{-2}$
BM 2	360 000	12 000	$3,3 \cdot 10^{-2}$
BM 3	460 000	1 000	$2,1 \cdot 10^{-3}$
BM 4	234 000	8 400	$3,6 \cdot 10^{-2}$
BM 5	430 000	1 200	$2,8 \cdot 10^{-3}$

Tab. D 3 : Aktivität im Blut bei Fehlinjektion und normaler i.p. Injektion nach 1 Tag

3. Metabolisierung von ^{3}H-Prolin

Nachdem durch obengenannte Ergebnisse grobe methodische Fehler ausgeschlossen waren, wurden in weiteren Vorversuchen die wesentlichen Parameter untersucht, die die Metabolisierung des Injektionspräparates bestimmen.

a. Abhängigkeit der Prolinmetabolisierung von Zusammensetzung des Injektionspräparates

So ergibt sich zunächst die Fragestellung, ob Resorption und Metabolisierung des ^{3}H-Prolins von der inaktiven Prolinmenge im Injektionspräparat abhängig ist. Die Einbauraten speziell des hier interessierenden Kollagens wurden, wie aus Tab. D 4 ersichtlich, an Hand der nach einem Tag im SSK gefundenen A_{sp} ermittelt. Dabei zeigt sich, daß die Erhöhung des inaktiven Prolingehalts auf das Vierfache keine Erhöhung, sondern eher eine Erniedrigung der Einbaurate mit sich bringt. Das in den Hauptversuchen verwendete Injektionspräparat ergibt den höchsten Wert. Die Verwendung eines alkoholischen Präparates mit basischem pH führt zu geringerer A_{sp} im SSK.

Charakteristik des Inj. Präp.	Prolingehalt (µmol/kg KG)	A_{sp} im SSK (nCi/mg Prot.)
in den Hauptvers. verwendet	1,2	$9,88 \cdot 10^{-1}$
erhöhter Prolingehalt	2,1	$9,38 \cdot 10^{-1}$
stark erhöhter Prolingehalt	5,0	$7,28 \cdot 10^{-1}$
Alkoholisches Präp., pH bas.	0,9	$6,05 \cdot 10^{-1}$

Tab. D 4 : Fragliche Abhängigkeit der Prolinmetabolisierung von Zusammensetzung des Injektionspräparates

b. Vergleich der Metabolisierung von ^{3}H- und ^{14}C-Prolin

Die Doppelmarkierung von Kontrolltieren mit ^{14}C- und ^{3}H-Prolin läßt den direkten Vergleich der Metabolisierung der beiden Tracersubstanzen zu. Es wurden die Verhältnisse der ^{14}C- und ^{3}H-Aktivität ($^{3}H/^{14}C$) jeweils im Injektionspräparat, in der Leber und in den Prolin- und OH-Prolinfraktionen des SSK nach einem Tag bestimmt (Kap. C.III.1.). Die Werte der A_{sp} in der Leber wurden dabei als Maß für gleiche Resorption und gleiches Angebot im Serum wie auch für dessen Schwankungen angesehen.

In Tab. D 5 sind die $^{3}H/^{14}C$ im Injektionspräparat sowie in den untersuchten Strukturen zusammengefaßt. Das Verhältnis $^{3}H/^{14}C$ aus den jeweiligen Injektionspräparaten der Einzeltiere findet sich in etwa im Leberprolin wieder. Geringe Abweichungen liegen im Bereich der Meßgenauigkeit, da durch die Division sich die Meßfehler addieren. Die A_{sp} von ^{14}C und ^{3}H ist nach Normierung auf gleiche Dosis fast gleich, die ^{14}C-Aktivität etwas (10%) höher. Die Leberaktivität ist absolut gesehen recht hoch, bereits hier sind die interindividuellen Schwankungen nicht unerheblich (120-158 nCi/ µmol).

Die A_{sp} des SSK-Prolins spiegelt dagegen das periphere Traceranngebot im Schwanz sowie den allgemeinen Eiweißumsatz der Fibrozyten wider. Bei einem möglichen Aktivitätsverlust bei der während der Kollagensynthese stattfindenden Hydroxylierung wäre das $^{3}H/^{14}C$ in der OH-Prolinfraktion erniedrigt. In Tab. D 5 sind die Werte für die A_{sp} in den SSK-Fraktionen wieder auf gleiche Dosis normiert. Die ^{14}C-Aktivität liegt wie in der Leber um etwa 10% höher als die der ^{3}H-Aktivität. Zwischen den 4 Tieren bestehen sehr hohe Schwankungen, am höchsten in ^{14}C-Prolin (3,0 - 7,17), ebenso im ^{14}C-OH-Prolin. Aufgrund der größeren Anzahl der counts, die der Berechnung der ^{3}H-A_{sp} zugrunde liegen, ist die hier gefundene Streuung etwas geringer. Insgesamt ist $^{3}H/^{14}C$ von Tier zu Tier jedoch sehr unterschiedlich (zwischen 22,7 und 31,8). Vergleicht man die Ergebnisse in Prolin und OH-Prolin, so ist $^{3}H/^{14}C$ in der letztgenannten Fraktion etwas höher, jedoch nie erniedrigt.

		A	B	C	D	Tier
Dosis (mCi/kg KG)	^{3}H	5,4	9,3	5,0	8,4	INJ. PRÄP.
	^{14}C	0,2	0,3	0,2	0,2	
	$^{3}H/^{14}C$	23,7	28,8	23,7	28,8	
A_{sp} (nCi/µmol)	^{3}H	158	139	120	135	LEBER
	^{14}C	169	151	133	166	
	$^{3}H/^{14}C$	25,7	28,9	26,0	25,7	
A_{sp} (nCi/µmol)	^{3}H	2,7	3,5	3,8	4,2	SSK PRO
	^{14}C	3,0	4,4	4,5	7,1	
	$^{3}H/^{14}C$	25,3	25,7	23,4	19,6	
A_{sp} (nCi/µmol)	^{3}H	3,4	3,0	3,4	4,5	SSK OH-PRO
	^{14}C	3,0	3,6	4,3	6,5	
	$^{3}H/^{14}C$	31,8	27,1	25,4	22,7	

Tab. D 5 : Vergleich von ^{3}H- und ^{14}C-Aktivität in Injektionspräparat, Leberprolin und Prolin- und OH-Prolinfraktion des Schwanzsehenkollagens

4. Spezifische Aktivität des freien Prolins im Serum von Kontrolltieren, diabetischen und alten Ratten

In den bisher dargestellten Ergebnissen wurde die Gleichwertigkeit des verwendeten ^{3}H-Prolins mit ^{14}C-Prolin als Tracersubstanz nachgewiesen. Da die A_{sp} in den untersuchten Strukturen sich jedoch verglichen mit den injizierten Aktivitätsmengen als relativ niedrig erwiesen, wurde durch Überprüfung des Verlaufs der spezifischen Aktivität des Prolins im Serum sowie seiner Metaboliten dessen Verbleib im Organismus untersucht (vgl. Kap. C.IV.).

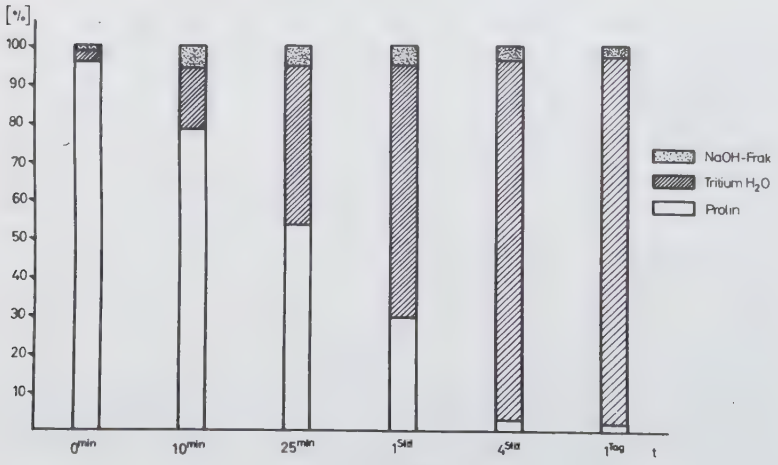


Abb. D 1 : Abnahme des Anteils der Prolinaktivität an Gesamtaktivität während des ersten Tages

a. Metabolisierung des ^{3}H-Prolins zu Tritium-Wasser

Wie Abb. D 1 zeigt, wird das injizierte ^{3}H-Prolin nach i.p. Injektion rasch fast ausschließlich zu Tritium-Wasser umgewandelt. Während im Injektionspräparat noch 95 % der Aktivität über Prolin lagen,

sind bereits nach 25 min nur noch 55 %, nach einer Stunde 30 %, nach 4 Stunden 2 % und nach einem Tag nur noch 0,3 % der Gesamtaktivität Prolinaktivität. Über anderen Aminosäuren der säurelöslichen Fraktion ist nach einem Tag keine wesentliche Aktivität nachzuweisen. Bei Diabetes und alten Tieren ist, verglichen mit den Kontrollen, kein Unterschied in der prozentualen Verteilung der Aktivitäten festzustellen (nicht graphisch dargestellt). Die Kurve der Tritium-Wasser-Aktivität ergibt sich aus den Resorptions- und Ausscheidungsverhältnissen. Aus Abb. D2 wurde die Halbwertszeit (HWZ) des Tritium-Wassers und damit praktisch der Gesamtaktivität ermittelt. Die HWZ der diabetischen Tiere ist gegenüber Kontrollen und alten Tieren wesentlich verkürzt (von etwa 7 auf 2,5 Tage).

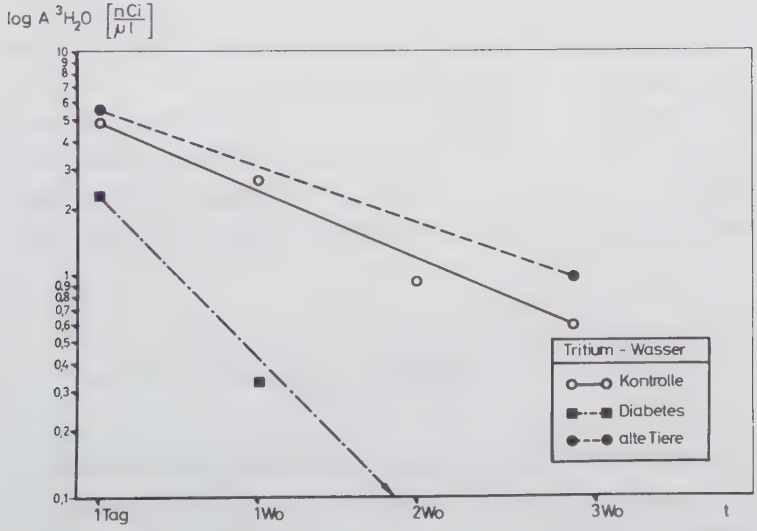


Abb. D2 : Zur Berechnung der HWZ von Tritium-H_2O

b. Verlauf der spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum

Um die Halbwertszeiten von verschiedenen Proteinpools ermitteln zu können, muß, wie in Kap. B.III. ausgeführt wurde, zuvor das Vorläuferangebot ermittelt werden. Dies entspricht in dieser Arbeit dem Verlauf der A_{sp} des freien Prolins im Serum. Insbesondere sollten in Vorversuchen eventuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen sowie der Einfluß der Wiederverwendung geklärt werden.

Wie aus Abb. D 3 ersichtlich, weisen die Kurven für den Verlauf der A_{sp} des freien Prolins im Serum einen sehr schnellen Anstieg und nachfolgend einen raschen, etwa exponentiellen Abfall auf. Das Maximum beträgt bei der Versuchsgruppe "Diabetes" 68 nCi/nmol und liegt bei 10 Minuten, bei den beiden anderen Gruppen 52 nCi/nmol zum Zeitpunkt 15 Minuten. Der Abfall vollzieht sich bei alten Tieren etwas langsamer, bei Diabetes ist er insbesondere nach längeren Zeiten beschleunigt. Nach einem Tag ist die spezifische Aktivität des Prolins bereits auf Werte um 0,02 nCi/nmol abgesunken, bei Diabetes auf noch 0,01. Nach drei Wochen weisen die diabetischen Tiere nur ein Viertel der spezifischen Aktivität der anderen Gruppen auf.

c. Halbwertszeit von freiem Prolin im Serum, Integral der Prolinwerte

Aus Abb. D 4 wurde die Halbwertszeit (HWZ) des freien Prolins im Serum kurz nach Injektion berechnet. Bei halblogarithmischer Auftragung wie in Abb. D 2 ergeben sich bei exponentiellem Abfall Geraden. In Abb. D 4 weisen diese einen Knick auf, nach etwa einer Stunde ändert sich also die HWZ. Bis zu einer Stunde betragen die HWZ für Kontrollen und Diabetes 22 min, für "Alt" 28 min. Danach bis 4 Stunden 50, 48 und 59 min für Kontrollen, Diabetes und Alt.

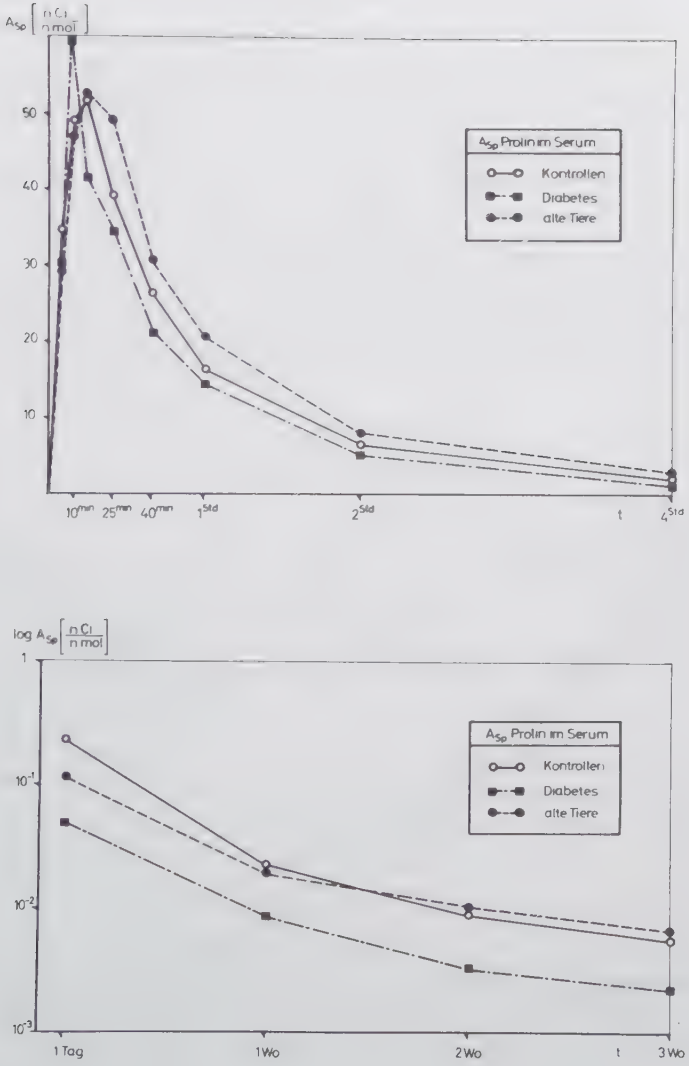


Abb. D 3 : Verlauf der spezifischen Aktivität A_{sp} des freien Prolins im Serum

Tab. D 6 zeigt die mit Hilfe der theoretischen Berechnungen (s. Kap. A. III. 3.) errechneten Werte für das Integral der Prolinaktivitäten. Sie wurden für die Berechnung der HWZ der untersuchten Strukturen herangezogen (s. u.). Wie man der Tabelle entnehmen kann, sind die sich ergebenden Unterschiede nicht unerheblich. Für Diabetes ist das Angebot erniedrigt, für alte Tiere leicht erhöht. Von einem Tag bis drei Wochen steigt das Integral bei den Kontrolltieren noch um 35 % an, bei Diabetes nur um 13 %.

In Tab. D 7 sind die wesentlichen Absolutwerte für den Verlauf der spezifischen Aktivitäten nochmals zusammengestellt.

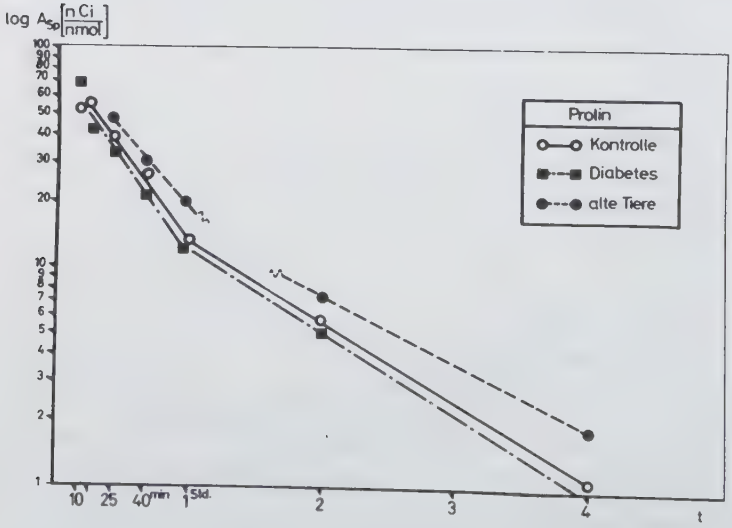


Abb. D 4 : Zur Berechnung der Halbwertszeit des freien Prolins im Serum kurz nach Markierung

Zeit t	A_{sp} (nCi · d/nmol)		
	Kontrollen	Diabetes	Alte Tiere
0 - 1 h	1, 3	1, 2	1, 4
0 - 1 d	2, 5	2, 1	3, 2
0 - 3 Wo	3, 4	2, 4	3, 8
1 d - 3 Wo (%)	35	13	18

Tab. D 6 : Integral der freien Prolinmenge im Serum

Zeit t	Aktivität (nCi/µl Serum) %-Werte vom Gesamtwert in Klammern			
	H_2O	Prolin	NaOH-Fraktion	Ges.
KONTROLLEN:				
10'	1,3 (16)	6,4 (77)	0,4 (7)	8,3 (100)
25'	2,4 (42)	2,9 (53)	0,2 (5)	5,6 (100)
1 h	3,3 (60)	1,6 (29)	0,2 (5)	5,5 (100)
4 h	4,8 (94)	0,1 (2)	0,2 (4)	5,1 (100)
1 d	5,2 (97,7)	0,01 (0,3)	0,12 (2,2)	5,4 (100)
DIABETES:				
10'	2,2 (19)	8,6 (74)	0,6 (7)	11,6 (100)
25'	2,8 (37)	4,3 (57)	0,4 (6)	7,6 (100)
1 h	4,6 (68)	1,7 (26)	0,3 (6)	6,7 (100)
4 h	6,1 (95)	0,1 (2)	0,2 (3)	6,4 (100)
1 d	3,8 (97,5)	0,01 (0,3)	0,08 (2,3)	3,9 (100)

Tab. D 7: Übersicht über in SLF auftretenden Aktivitäten

II. Ergebnisse der HAUPTVERSUCHE

1. Entwicklung von Gewicht und Blutzucker nach Diabetisierung mit Streptozotocin

Wie in Kap. C.II. beschrieben, wurde der experimentelle Diabetes mellitus der entsprechenden Versuchsgruppe für die Hauptversuche mit Hilfe des Antibiotikums Streptozotocin erzeugt. Aus Abb. D 5 ist die Entwicklung von Körpergewicht und Blutzucker nach Injektion der diabetogenen Substanz sowie die entsprechende Verlaufskurve der Kontrolltiere zu ersehen.

Während das Körpergewicht der Kontrolltiere im Lebensalter von 8 bis 22 Wochen noch stark zunimmt (von 175 auf 422 g), bleibt es bei der Streoptozotocin-injizierten Gruppe fast konstant. Die Streuung wird dabei bei der letztgenannten Gruppe immer größer (243 $\pm$ 53 g bei 22 Wochen).

Der untere Teil der Abbildung zeigt die Blutzuckerverlaufskurve. Nach Injektion ergibt sich innerhalb einer Woche ein steiler Anstieg der Blutzuckerwerte auf im Durchschnitt über 400 mg %, verbunden mit einer sehr starken Streuung ($\pm$ 75 mg %). Die Kontrollen wiesen keine spontane Diabetesentwicklung auf, hier waren die Streuungen sehr gering.

Das Allgemeinwachstum der diabetischen Tiere war stark eingeschränkt. So betrug beispielsweise das Schwanzgewicht der 19 Wochen alten, diabetischen Tiere im Mittel nur 5 g gegenüber 8, 5 g bei Normaltieren, die Schwanzlänge nur 15, 5 cm gegenüber 18, 5 cm.

Bei allen diabetischen Tieren fand sich eine starke Erhöhung der Trinkmenge auf das 2-3 fache des Normalwertes, eine gesteigerte Nahrungsaufnahme, starke Glucosurie und eine Proteinurie in Spuren (s. auch WEBER und ROMEN, 1979). Remissionen diabetischer Tiere wurden nicht beobachtet.

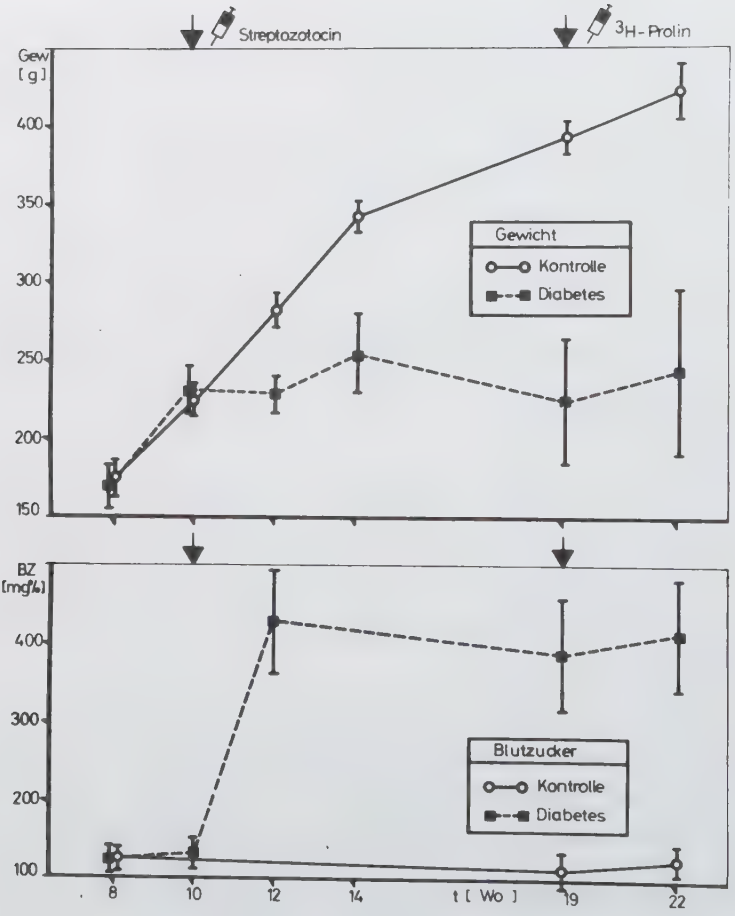


Abb. D 5 : Entwicklung von Blutzucker und Körpergewicht nach Injektion von Streptozotocin

2. Isolierung der glomerulären Basalmembran (GBM)

Der Schwerpunkt der Fragestellung dieser Arbeit liegt in der Bestimmung des Turnover der GBM. Für die Aussagekraft der Ergebnisse ist eine angemessene Qualität in der Isolierung der GBM erforderlich. In diesem Kapitel sollen die von uns erarbeiteten Ergebnisse der Isolation nach der Methode von KRAKOWER und GREENSPON (1951) dargestellt werden.

a. Morphologische qualitative und quantitative Beschreibung der isolierten Fraktionen

In Tab. D 8 und D 9 sind die quantitativen Ergebnisse zur Glomerulusisolierung zusammengestellt. Die Nierenfeuchtgewichte pro Nierenpaar erwiesen sich bei Diabetes gegenüber Kontrollen als nicht erhöht, wohl aber bei der Versuchsgruppe der alten Tiere. Pro Gramm Nierenfeuchtgewicht lassen sich insgesamt bei Siebung durch zwei Netze (80 µm und 48 µm, s. Kap. C. VI.) zwischen 6000 und 8000 Glomeruli gewinnen, bei Siebung durch nur ein 80 µm-Netz etwa 4000. An GBM-Trockensubstanz ergeben sich aus einem Nierenpaar zwischen 0, 4 und 1 mg.

Die Anzahl der Glomeruli auf dem 48 µm Netz war stets wesentlich höher als auf dem 80 µm Netz. Eine Ausnahme bildet der Eintageswert der Kontrolltiere, hier war während der Isolierung das 48 µm Netz gerissen.

Der Gesamtdurchschnitt der Glomerulusdurchmesser ist bei normalen und diabetischen Tieren gleich (110 ± 13 bzw. ± 15 µm), bei alten Tieren wesentlich größer (151 ± 20 µm). Tab. D 10 zeigt die Glomerulusdurchmesser der Auflagerungen auf den Netzen unterschiedlicher Porenweite. Obwohl die 48 µm Netzauflagerung bereits das 80 µm Netz passiert hat, beträgt der Glomerulusdurchmesser dort 107 µm.

Bei Aufstellung eines Histogramms für die auf den einzelnen Netzen gefundenen Glomerulusdurchmesser (nicht graphisch dargestellt) ergeben sich leicht rechtsschiefe Verteilungen. Die Trennung in größere und kleinere Glomeruli ist unterschiedlich gut, jedoch im allgemeinen vollzogen.

Versuchs-gruppe	Nieren-paare	Nieren-gew. (g)	Anz. Glom. /g Niere	Glom. ∅ (µm)
Kontr. 1 d	19	2,47 ± 0,21	8200	110 ± 18
Kontr. 3 Wo	20	2,59 ± 0,21	5900	110 ± 18
Diab. 1 d	14	2,39 ± 0,26	7400	110 ± 15
Diab. 3 Wo	20	2,51 ± 0,31	8100	110 ± 15
Alt 1 d	10	2,98 ± 0,34	3700	151 ± 20
Alt 3 Wo	15	3,11 ± 0,17	4000	151 ± 20

Tab. D 8 : Daten zur Glomerulusisolierung

Gruppe, Netz	Kollagen Gew. (mg)	Anzahl Glom.	Kollagen /Glom. (ng)	OH-Pro /Glom. (pmol)	Pro /Glom. (pmol)
Kontr. 1 d, 48 µm	11, 8	211 500 ± 18 500	56	14, 5	17, 9
Kontr. 1 d, 80 µm	19, 6	173 500 ± 18 500	113	33, 6	47, 3
Kontr. 3 Wo, 48 µm	16, 5	228 000 ± 47 500	73	18, 8	19, 9
Kontr. 3 Wo, 80 µm	3, 1	80 750 ± 18 500	38	5, 1	6, 6
Diab. 1 d, 48 µm	6, 3	175 500 ± 25 700	36	7, 9	10, 7
Diab. 1 d, 80 µm	3, 2	73 750 ± 17 000	43	6, 0	11, 2
Diab. 3 Wo, 48 µm	15, 4	321 750 ± 57 000	48	14, 5	18, 8
Diab. 3 Wo, 80 µm	3, 9	86 500 ± 14 500	45	12, 9	15, 8
Alte 1 D, 80 µm	3, 8	109 800 ± 16 700	28	12, 2	11, 6
Alte 3 Wo, 80 µm	6, 8	186 750 ± 31 600	28	17, 9	13, 0

Tab. D 9 : Glomerulusisolierung, Menge des Kollagens, OH-Prolins und Prolins pro Glomerulus

Versuchsgruppe	Netzaufl. 48 µm Maschenweite Glom. ∅ (µm)	Netzaufl. 80 µm Maschenweite Glom. ∅ (µm)	Gesamt Glom. ∅ (µm)
Kontrollen	107, 3 ± 18, 4	118, 3 ± 16, 9	110, 0 ± 18, 0
Diabetes	107, 0 ± 16, 2	120, 2 ± 13, 8	110, 2 ± 15, 5
Alte Tiere	∅	151, 4 ± 20, 2	∅

Tab. D 10 : Durchschnittliche Glomerulusdurchmesser der einzelnen Netzauflagerungen

Die Abb. D 6 - D 10 stellen lichtmikroskopische Aufnahmen der isolierten Glomerulusfraktionen dar. Grundsätzlich fanden sich folgende Bestandteile in den einzelnen Auflagerungen:

1. Isolierte Glomeruli mit und ohne Bowman'sche Kapsel. Bei erhaltener Bowman'scher Kapsel erscheint die Abgrenzung der Glomeruli optisch schärfer (Abb. D 7, D 9)
2. Glomeruli mit Tubulusbasalmembranschlauch (Abb. D 10)
3. Reine Tubuli
4. Schleierartige Gebilde, wahrscheinlich leere Tubulusbasalmembranschläuche (Abb. D 8)
5. Interstitielle Bindegewebsfetzen (Abb. D 7), praktisch nur auf 80 µm Netz

Die quantitative Auswertung ergab ohne Berücksichtigung der Schleier stets über 95 % Glomeruli, Glomeruli mit Tubulusanhang unter 3 %, reine Tubuli unter 2 %. Der Anteil der Schleier war nicht quantifizierbar. Er betrug wechselnd bis ca. 25 % beim Eintageswert der Kontrollen. Die Glomeruli waren zu über 50 % zerrissen oder zerquetscht. Auf dem 80 µm Netz waren sie dem lichtmikroskopischen Augenschein nach größer als es dem gemessenen Unterschied entspricht.

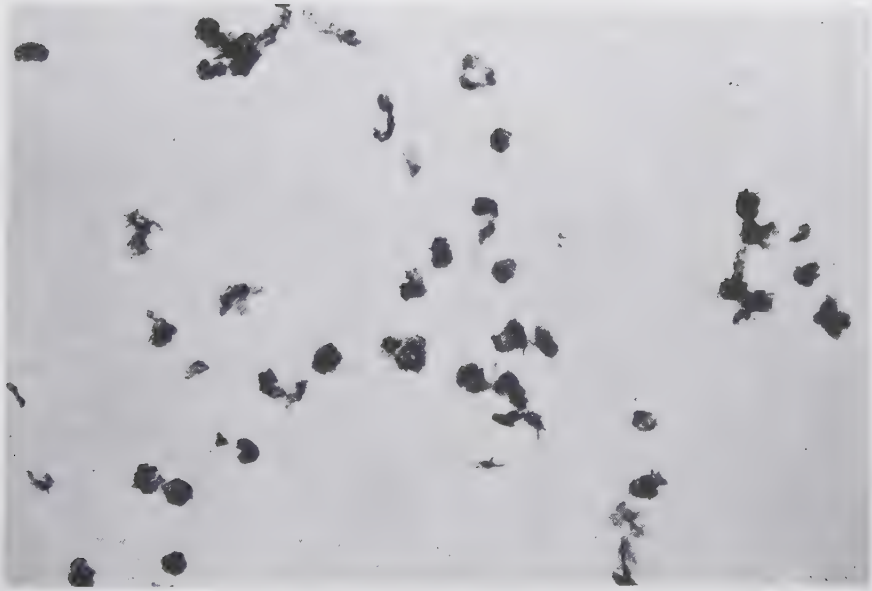


Abb. D 6 : 48 µm-Netzaufl., Kontrollratten, V = 1 : 52, 8, H-E

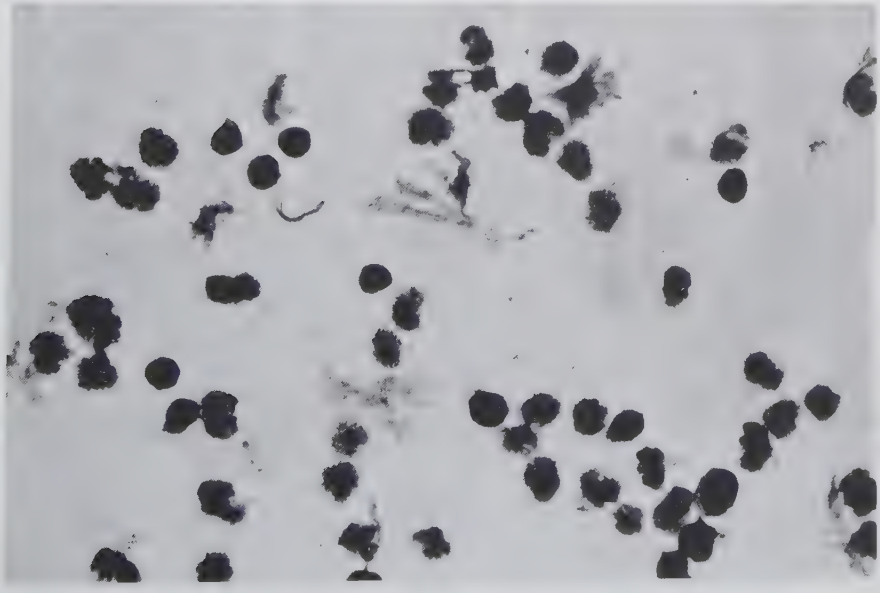


Abb. D 7 : 80 µm-Netzaufl., Kontrollratten, V = 1 : 52, 8, H-E

Abb. D 8 : 80 µm-Netzaufl., vorwiegend mit Glomeruli, Alte Tiere, V = 1 : 52, 8, H-E

Abb. D 9 : Einzelne Glomeruli, Alte Tiere, V = 1 : 211, H-E (Ausschnitt aus D 8)

Abb. D 10 : Glomerulus mit Tubulusanteil, V = 1 : 211 , H-E

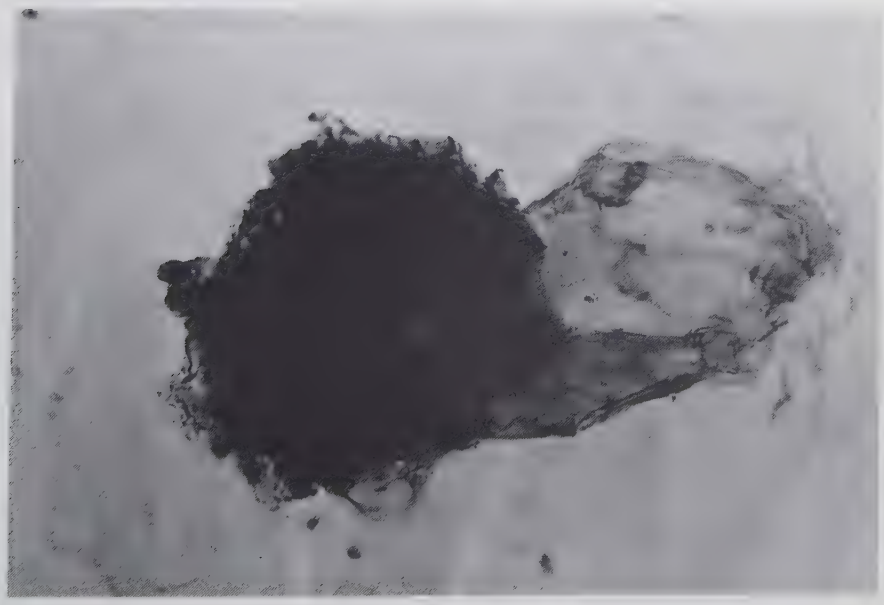


Abb. D 11 : Glomerulus mit aufgerissener Bowman-Kapsel,
V = 1 : 52, 8 H-E

b. Einfluß der Isolierung auf biochemische Zusammensetzung und spezifische Aktivität der glomerulären Einzelfraktionen

Die glomerulären Einzelfraktionen, die sich durch die jeweiligen Auflagerungen auf den Netzen verschiedener Maschenweite ergeben, unterscheiden sich, wie oben beschrieben, lichtmikroskopisch nur unwesentlich. In dieser Arbeit wurden alle Einzelfraktionen weiterverarbeitet und deren biochemische Zusammensetzung und spezifische Aktivität geprüft. Dadurch ergab sich die Möglichkeit zur Klärung der Frage, ob es zulässig ist, nur die 48 µm Fraktion für die Grundaussage dieser Arbeit zu verwenden.

In Tab. D 11 sind, teilweise im Vorgriff auf Ergebnisse des Kap. D. II. 7., biochemische Charakteristika und spezifische Aktivitäten der 80 µm und 48 µm Fraktion gegenübergestellt. Für jeden Versuch gilt, daß die Verhältnisse OH-Pro/Pro auf den 48 µm Netzen höher sind. Die A_{sp} des OH-Prolins ist für Eintages- und 3-Wochenwert der Kontrollen auf beiden Netzen fast gleich. Bei Diabetes sind die Werte auf dem 48 µm Netz geringer als auf dem 80 µm Netz. Die A_{sp} des Prolins ist für Kontrolle 3 Wochen und Diabetes 3 Wochen gleich. Beim Eintageswert der Kontrollen ist sie auf dem 48 µm Netz geringer, was auf den Netzriß zurückzuführen sein wird. Vergleicht man jeweils Eintages- und 3-Wochenwert, so verhalten sich die Netzfraktionen untereinander sehr ähnlich.

Die zum Vergleich angegebenen Werte für ein Nierenproteingemisch ohne Isolierung korrespondieren mit dem 3-Wochenwert der alten Tiere. Das Verhältnis OH-Pro/Pro ist hier wesentlich geringer, die A_{sp} des OH-Prolins leicht erniedrigt, die des Prolins stark erhöht.

	80 µm			48 µm		
	(4)-OH-Pro /Pro	A_{sp} OH-Pro	A_{sp} Pro	(4)-OH-Pro /Pro	A_{sp} OH-Pro	A_{sp} Pro
Kontr., 1 d	0, 72	3, 4	30, 8	0, 81	3, 6	38, 4
Kontr., 3 Wo	0, 76	4, 6	6, 7	0, 94	4, 8	7, 1
Diab., 1 d	0, 53	3, 4	25, 8	0, 74	2, 6	18, 3
Diab., 3 Wo	0, 69	3, 5	3, 9	0, 77	3, 0	3, 9
Alte, 1 d	1, 05	2, 5	26, 8			
Alte, 3 Wo	1, 02	3, 9	8, 1			
Zum Vergleich: Nierengemisch (Alte Tiere, 3 Wochen) ohne Isolierung						
	0, 13	3, 1	14, 8			

Tab. D 11 : Gegenüberstellung 80 µm- und 48 µm-Fraktion der GBM, Verhältnis OH-Prolin/Prolin und spez. Aktivität A_{sp} (in nCi/µmol)

3. Morphologie des Schwanzsehnenkollagens in Abhängigkeit des Alters der Versuchstiere

Eine qualitativ hochwertige Isolierung des Schwanzsehnenkollagens (SSK) bereitet im Gegensatz zu Arbeiten an der GBM keine Schwierigkeiten. Hier lag vielmehr der Schwerpunkt des Interesses bei der morphologischen Untersuchung auf dem Verhältnis des extrazellulär liegenden Kollagens zur Anzahl der kollagenproduzierenden Zellen (= Fibrozyten). Wie sich aus der Definition der spezifischen Aktivität ergibt, kann diese bei einem höheren Anteil an extrazellulär liegendem Kollagen erniedrigt erscheinen, obwohl die Syntheseaktivität der Fibrozyten unverändert bleibt.

Wie aus Abb. D 12 und D 13 erkennbar, ist das obengenannte Verhältnis insbesondere vom Alter der Versuchstiere abhängig. Beide Abbildungen stellen repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Längsschnitten durch Rattenschwanzsehnen dar. Im oberen Bild erscheinen Zellkerne und -leib wesentlich größer und aufgetriebener als die langgestreckten Fibrozyten der alten Tiere. Hier sind die Cytoplasmaanteile der Fibrozyten nicht mehr zu erkennen.

In Tab. D 12 sind obengenannte Ergebnisse quantifiziert. Das mittels Zählraster bestimmte Verhältnis Kernfläche/Kollagenfläche sowie Kernanzahl/Kollagenfläche nimmt bei 1, 9 Jahre alten Ratten im Vergleich zu 8 Wochen alten Ratten um den Faktor 3 ab.

	Kernfläche/ Kollagenfläche · 100 (%)	Kernanzahl/ 100 Zählpunkte Kollagen (-)
Junge Ratten 8 Wo	$19,7 \pm 7,0$ (n = 9)	223 ± 34 (n = 9)
Alte Ratten 1, 9 J	$6,6 \pm 2,6$ (n = 12)	72 ± 20 (n = 12)

Tab. D 12 : Zellkernfläche und -anzahl/Kollagenfläche bei jungen und alten Ratten in der Schwanzsehne

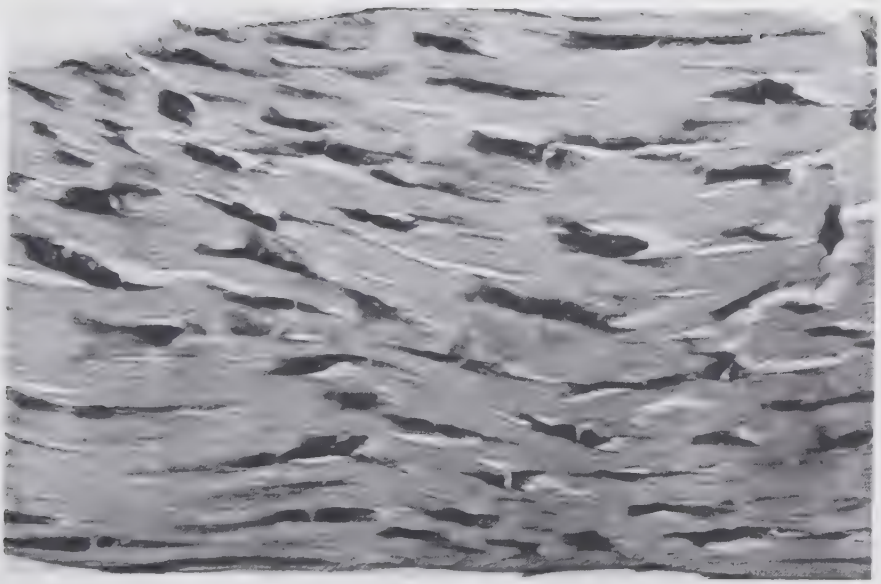


Abb. D 12 : Schwanzsehne einer 8 Wo alten Ratte. V = 1 : 528
H-E

Abb. D 13 : Schwanzsehne einer 1, 9 Jahre alten Ratte. V = 1 : 528
H-E

4. Einfluß des Alters der Versuchstiere auf Einbau- und Hydroxylierungsrate

Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt wurde, muß die A_{sp} des SSK eines alten Tieres also etwa mit dem Faktor 3 multipliziert werden, um daraus Rückschlüsse auf die Syntheseaktivität der Fibrozyten im Vergleich mit sehr jungen Tieren ziehen zu können. Selbst unter Berücksichtigung dieser Tatsache lassen sich die großen Unterschiede in der A_{sp} des SSK nicht erklären, die zwischen den Ergebnissen der Vor- und Hauptversuche bestehen. In einem getrennten Kontrollversuch wurden sonst gleichbehandelte Tiere unterschiedlichen Alters aktiviert und deren Einbauraten und Hydroxylierungsraten verglichen.

Tab. D 13 beinhaltet die Ergebnisse dieses Versuchs. Die spezifischen Aktivitäten des Prolins in der LEBER sind bei allen Versuchsgruppen, also für die Lebensalter 8 bis 90 Wochen, praktisch gleich (138 bis 151 nCi/µmol).

Die A_{sp} des Prolins im SSK ist bei 8 Wochen alten Tieren durchschnittlich 2,8 nCi/µmol, bei 19 Wochen alten Tieren mit 1,1 deutlich niedriger, 0,9 für 90 Wochen. Unter Berücksichtigung der oben dargestellten Zunahme des extrazellulär liegenden Kollagens ist die Syntheseaktivität jedoch ebenfalls gleichgeblieben.

Die A_{sp} des OH-Prolins im SSK nimmt bei Alterszunahme der Tiere von 8 auf 19 Wochen mindestens um eine Zehnerpotenz ab (von wenigstens 1,5 auf 0,09). Die weitere Abnahme auf 0,03 bei 90 Wochen alten Tieren ist wieder unter dem Aspekt der Zunahme des Kollagens zu sehen.

Gruppe:	Junge Ratten Vorversuch	Junge Ratten Kontr. vers.	Kontrollratten Hauptvers.	Alte Ratten Hauptvers.
Alter (Wo.)	8	8	19	ca. 90
Anzahl	4	2	21	10
Gew. ∅ (g)	220	180	422	550
A_{sp} Leberprolin (nCi/µmol)	138, 1	140, 1	148, 1	151, 8
A_{sp} SSK Pro (nCi/µmol)	3, 6	2, 2	1, 1	0, 9
A_{sp} SSK OH-Pro (nCi/µmol)	3, 7	1, 5	0, 09	0, 03

Tab. D 13 : Einbauraten von ^{3}H-Prolin in Gewebe von Versuchsgruppen unterschiedlichen Alters

5. Einbauraten und Turnover der Lebern gesunder, diabetischer und alter Tiere

Neben den beiden Kollagentypen wurde in dieser Arbeit die A_{sp} der Lebern der Versuchstiere nach einem Tag ermittelt (Methodik s. Kap. C.VI.4.). Da das untersuchte Material einem Gemisch verschiedener Leberproteine entspricht, ist eine Bestimmung des 3-Wochenwertes nicht sinnvoll. Vielmehr soll die nach einem Tag bestimmte A_{sp} als Ausdruck des Vorläuferangebots gelten, das den jeweiligen Versuchsgruppen zur Verfügung stand. Ebenso kann aus der A_{sp} der Leber Rückschlüsse auf die allgemeine Proteinsynthese gezogen werden.

Gruppe	A_{sp} (nCi/µmol)			
	im Blut	in Leber	in GBM	in SSK
Kontrollen	230	151, 8	38, 4	1, 06
Diabetes	72	74, 8	15, 8	0, 28
Alte Tiere	112	148, 1	26, 8	0, 95
junge Tiere	230	137, 8	∅	3, 7

Tab. D 14 : Vergleich der spezifischen Aktivität A_{sp} über Prolin nach 1 Tag in verschiedenen Geweben

In Tab. D 14 werden die A_{sp} der Leber denen anderer Gewebe gegenübergestellt. Man sieht, daß nach einem Tag die A_{sp} im Serum (freies Prolin) in der gleichen Größenordnung wie die der Leber liegt. Die A_{sp} über Prolin in der Leber ist nach einem Tag für Kontrollen, alte und sehr junge Tiere gleich, bei diabetischen Tieren beträgt sie nur etwa die Hälfte. Daraus ergibt sich mit Hilfe der in Kap. B.III.3. genannten Formel (7) folgende Ergebnisse für die Halbwertszeit:

Kontrollen 11, 8 Tage, Diabetes 20, 2 Tage, Alte Tiere 14, 9 Tage.

Diese HWZ sind ohne Berücksichtigung des Abbaus berechnet und liegen tatsächlich sicher niedriger.

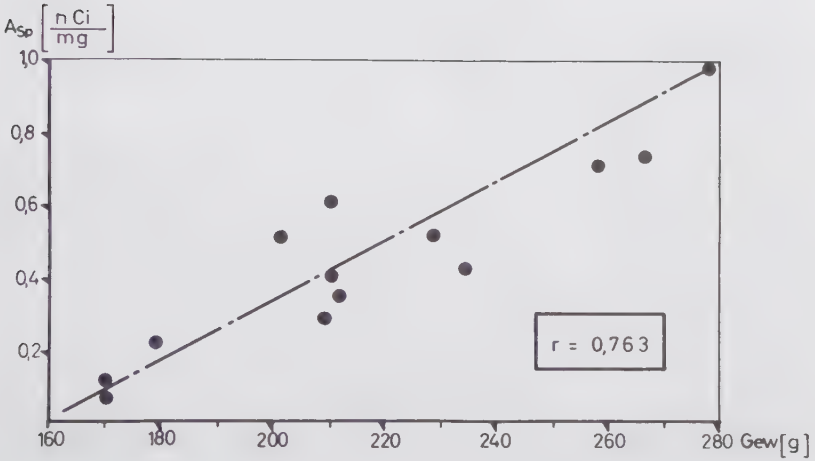


Abb. D 14 : Zusammenhang zwischen Gewicht und im Schwanzsehnenkollagen gefundener Gesamtaktivität bei diabetischen Ratten

6. Befunde des Schwanzsehnenkollagens der drei verschiedenen Versuchsgruppen

Die Präparation des Schwanzsehnenkollagens (SSK) ist im Vergleich zur GBM in qualitativer und quantitativer Hinsicht sehr viel einfacher. Da die erhaltenen Mengen für Einzelmessungen absolut ausreichend sind und weiterhin die Aminosäureanalyse des SSK aus der Literatur bekannt ist, wurde dieses Kollagen als Referenzsubstanz zur GBM untersucht.

a. Aminosäurenzusammensetzung des SSK

Tab. D 15 gibt die von uns ermittelten Werte für die Aminosäurenzusammensetzung des SSK der drei Versuchsgruppen wieder. In der rechten Spalte sind zum Vergleich Werte aus der Literatur angegeben. Unsere Ergebnisse stellen den Durchschnittswert von zwei Analysen dar, die jeweils Mischproben von 10 bis 20 Tieren entsprechen. Die von uns gefundenen Werte für die Normaltiere zeigen eine gute Übereinstimmung mit denen von PIEZ et al. (1963). Bei Diabetes erweist sich die Aminosäurenzusammensetzung als im wesentlichen unverändert. Bei alten Tieren dagegen ist der Anteil des (3)-OH-Prolins auf das Dreifache erhöht, ebenso steigt der Anteil des (4)-OH-Prolins von 94 auf 121 Promille. Nicht verändert dagegen sieht man den Gehalt an OH-Lysin, Lysin sowie das Verhältnis dieser beiden Aminosäuren zueinander. Der Glycingehalt ist bei alten Tieren um etwa 10% niedriger als bei Kontrollen und bei Diabetes.

b. Vergleich der Ergebnisse von Einzeltieren

Den Inhalt dieses Kapitels stellt das Ergebnis des Versuchs dar, die sich ergebenden Fehler und Maßzahlen der Streuung abzuschätzen.

In Tab. D 16 sind die Ergebnisse des Gehalts an Prolin, OH-Prolin

	Kontrollen [‰]	Diabetes [‰]	Alte Tiere [‰]	Kontrollen (PIEZ et al. 1963) [‰]
3-OH-Pro	4	4	13	4
4-OH-Pro	94	98	121	90
Asparaginsäure	51	50	55	47
Threonin	19	16	19	20
Serin	37	30	37	43
Glutaminsäure	62	64	59	71
Prolin	111	119	132	122
Glycin	340	340	299	330
Alanin	107	100	101	107
Valin	28	32	26	23
Cystein	§	§	§	§
Methionin	§	§	§	8
Isoleucin	14	18	15	23
Leucin	26	30	27	24
Tyrosin	4	5	6	4
Phenylalanin	14	14	13	12
OH-Lys	6	6	8	12
Lys	27	26	30	27
Histidin	5	4	6	4
Arginin	45	44	51	50
OH-Pro/Pro	0,88	0,86	1,01	0,77
OH-Lys/Lys	0,22	0,23	0,26	0,44

Tab. D 15 : Aminosäurenanalyse des SSK (Anteile A.s./1000 A.s.)

§: Wegen Hydrolyseverlusten auf Auswertung verzichtet

Diabetes: 12 Wochen manifest

Alte Tiere: 1,9 Jahre

und die A_{sp} der beiden Aminosäuren von fünf gleichbehandelten Kontrolltieren nach einem Tag zusammengestellt und mit den Durchschnittswerten der Mischproben von 21 Tieren verglichen. Die Durchschnittswerte der Einzelproben stimmen mit den Werten der Mischprobe sehr gut überein. Die Streuung für den Gehalt der Proben an Prolin und OH-Prolin sind gering (Variationskoeffizient V kleiner als 5 %), ebenso für deren Verhältnis.

Vergleichbar klein ist weiterhin der Variationskoeffizient der A_{sp} des Prolins (3,2 %). Für die A_{sp} des OH-Prolins ergibt sich, daß die Werte für die Ratten "7A" und "8B" wesentlich tiefer liegen als für die anderen Ratten. Entsprechend groß ist hier die Streuung, deren Berechnung bei der vorliegenden Verteilung der Werte auch nicht sinnvoll ist.

Eine Besonderheit ergab sich bei der Ermittlung der A_{sp} der diabetischen Tiere. In Abb. D 14 ist der Zusammenhang zwischen Gesamtaktivität der SSK-Proben und dem Körpergewicht der diabetischen Tiere dargestellt. Diese entspricht nach einem Tag in etwa der A_{sp} des Prolins, da 90% der Aktivität über Prolin liegen. Die Angabe in Abb. D 14 erfolgte in nCi/mg Gesamtprotein. Die Körpergewichte dieser diabetischen Versuchsgruppe schwankten zwischen 170 und 280 g. Die Gesamtaktivität des SSK war bei einigen Tieren um den Faktor 5 größer als bei Tieren der gleichen Versuchsgruppe. Bei Auftragung der A_{sp} gegen das Körpergewicht der Tiere ergibt sich eine lockere lineare Abhängigkeit (Korrelationsfaktor r = 0,763). Weiterhin wurde insbesondere bei den Tieren eine positive Abweichung von der Geraden festgestellt, die einige Tage vor dem Versuch steigende Gewichtstendenz aufwiesen und umgekehrt (nicht graphisch dargestellt). Abschließend seien noch die Ergebnisse und Streuungen der Gesamtaktivität nach einem Tag zusammengestellt:

Kontrollen	$1,52 \pm 0,24$ (nCi/mg)	(n = 21)
Diabetes	$0,46 \pm 0,23$ (nCi/mg)	(n = 14)

Bezeichnung	Menge Pro (µmol/ml)	Menge OH-Pro (µmol/ml)	Verh. OH-Pro/Pro (-)
HN-2B	7, 05	5, 56	0, 79
HN-4A	7, 05	5, 33	0, 76
HN-5C	7, 41	5, 64	0, 76
HN-7A	7, 12	6, 25	0, 87
HN-8B	6, 75	6, 05	0, 89
ø	7, 07 ± 0, 23	5, 76 ± 0, 37	
Mischpr.	6, 92	5, 55	0, 80

Bezeichnung	A_{sp} OH-Pro (nCi/µmol)	A_{sp} Pro (nCi/µmol)	Verh.d. A_{sp} (-)
HN-2B	0, 12	0, 90	7, 52
HN-4A	0, 151	0, 987	6, 52
HN-5C	0, 112	0, 896	8, 01
HN-7A	0, 046	0, 868	18, 9
HN-8B	0, 032	0, 92	28, 2
ø	0, 091 ± 0, 05	0, 91 ± 0, 03	10
Mischpr.	0, 089	1, 06	12, 5

Tab. D 16 : Vergleich der Ergebnisse des SSK von 5 gleichbehandelten Kontrolltieren

c. Spezifische Aktivität A_{sp} des Prolins

Neben der A_{sp} des OH-Prolins wurde für jeden Versuchspunkt der Hauptversuche auch die A_{sp} des Prolins bestimmt. Diese Aminosäure ist jedoch nicht für Kollagen spezifisch und kommt praktisch in jedem Eiweiß vor. Die Ergebnisse der A_{sp} dieser Nicht-Kollagen-Proteine (NCP) sind in Abb. D 15 graphisch dargestellt.

Die A_{sp} des Prolins im SSK ist nach einem Tag, verglichen mit anderen Proteinen, sehr niedrig (1,06 nCi/µmol). Alle Werte entsprechen Mischproben aus mindestens 10, meist jedoch mehr als 15 Tieren. Nach 3 Wochen ist die A_{sp} des SSK der Kontrollen auf 0,22 nCi/µmol abgefallen.

Bei der Versuchsgruppe der diabetischen Tiere findet man nach einem Tag wesentlich geringere Werte als bei den Kontrollen (0,28 nCi/µmol), der Abfall auf 0,2 nCi/µmol ist vergleichsweise gering.

Der Verlauf der A_{sp} der alten Tiere entspricht dem der Kontrollen.

Unter der Annahme, daß das Maximum der NCP-Komponente nach einem Tag bereits überschritten ist, ergeben sich aus dem Abfall: HWZ für Kontrollen kleiner als 15 Tage, für Diabetes kleiner als 21 Tage und für Alte Tiere kleiner als 17 Tage.

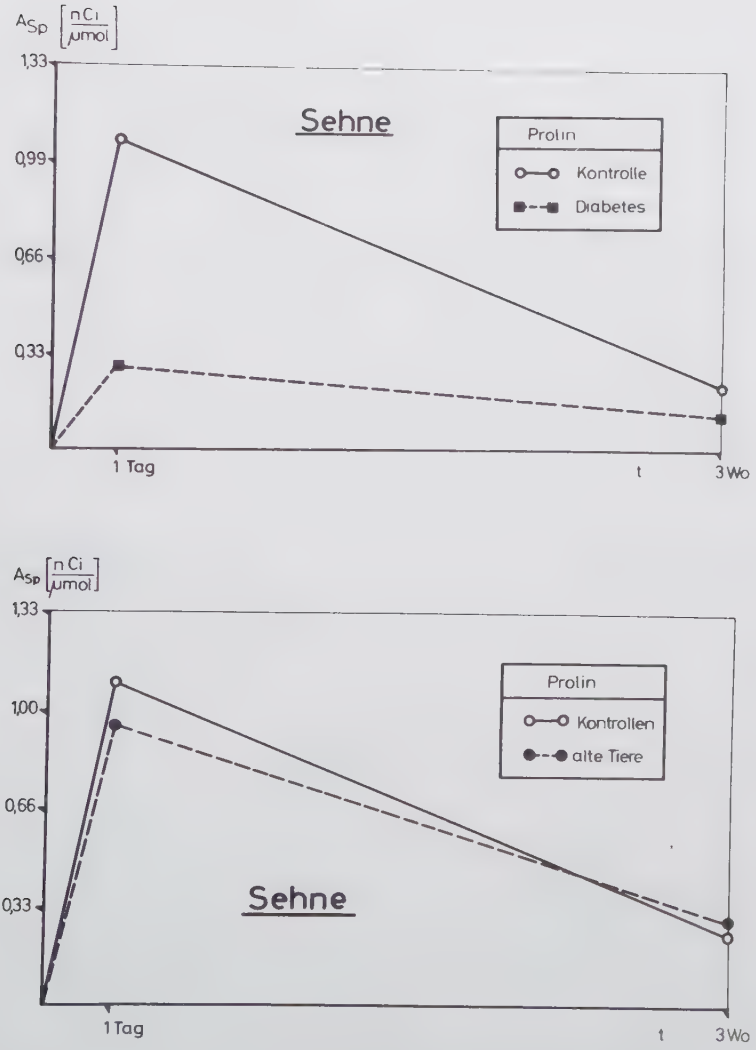


Abb. D 15 : Spezifische Aktivität A_{sp} des Prolins im Schwanzsehnenkollagen

d. Spezifische Aktivität A_{sp} des OH-Prolins

Die A_{sp} des OH-Prolins und damit des Parameters für Kollagen ist schließlich in Abb. D 16 zu finden.

Für Kontrollen ist die A_{sp} des OH-Prolins im SSK nach einem Tag etwa ein Zehntel des Prolinwertes ($8,7 \cdot 10^{-2}$ nCi/µmol), nach drei Wochen ist sie etwa ebenso groß und damit in der Größenordnung der des Prolins.

Bei diabetischen Tieren findet man nach einem Tag nur $1,3 \cdot 10^{-2}$ nCi/µmol, nach drei Wochen $10,1 \cdot 10^{-2}$ nCi/µmol, also ungefähr den siebenfachen Wert, der den der Kontrolltiere sogar etwas übersteigt.

Die alten Tiere weisen einen ähnlichen Verlauf wie die diabetischen auf. Die A_{sp} steigt von $2,6 \cdot 10^{-2}$ auf $6,3 \cdot 10^{-2}$ nCi/µmol an, ebenfalls eine Zunahme um mehr als 150 %.

Eine eindeutige Berechnung der HWZ ist mit dieser Wertekonstellation nicht möglich.

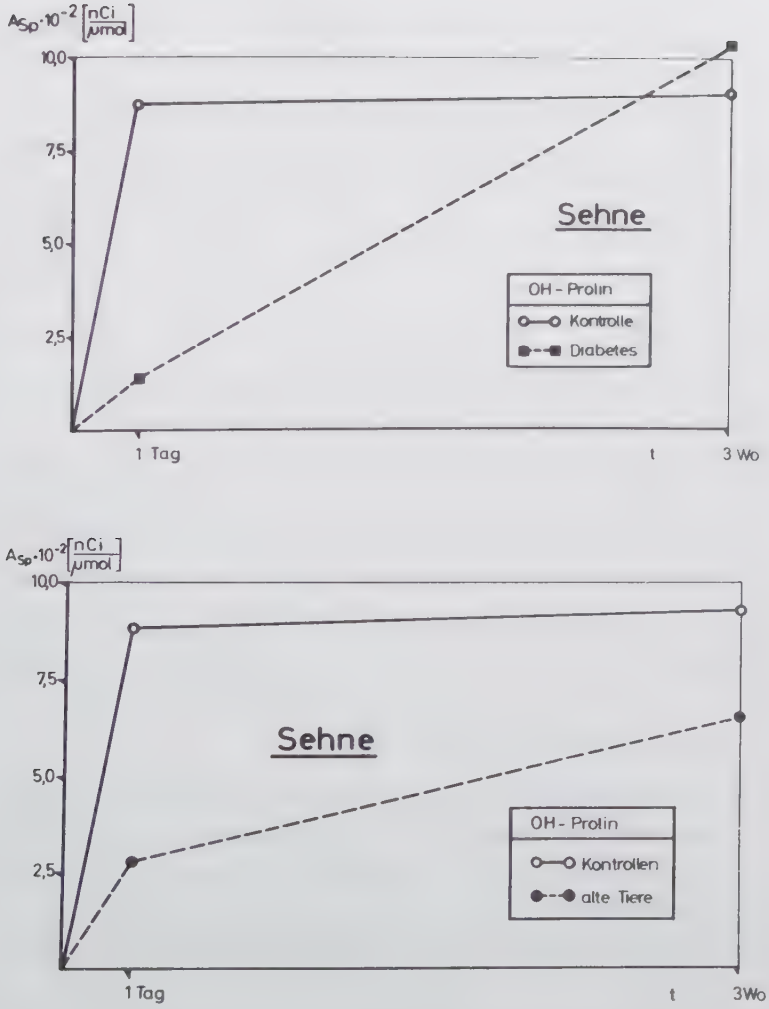


Abb. D 16 : Spezifische Aktivität A_{sp} des OH-Prolins im Schwanzsehnenkollagen

7. Befunde der glomerulären Basalmembran (GBM) gesunder, diabetischer und alter Tiere

Die GBM steht im Mittelpunkt der Fragestellung dieser Arbeit. Die vorliegenden Ergebnisse bieten die Möglichkeit, die GBM aus drei verschiedenen Gesichtspunkten zu untersuchen:
Die Aminosäurenzusammensetzung der GBM als Ausdruck eventueller qualitativer Veränderungen, die A_{sp} des Prolins als Parameter des Umsatzes der Nichtkollagenkomponente und schließlich die A_{sp} des OH-Prolins für den Kollagenumsatz.

a. Aminosäurenzusammensetzung der GBM

Tab. D 17 zeigt die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse der GBM der drei Versuchsgruppen in Gegenüberstellung mit den Werten von BEISSWENGER (1976). Letztere resultieren aus Untersuchungen an 16 Monaten alten Ratten, wobei die Diabetes-Gruppe seit 14 Monaten diabetische Stoffwechsellage aufwies. Die Normaltiere sind somit fast mit unserer Versuchsgruppe "Alte Tiere" zu vergleichen.

Jeder unserer Werte stellt den Durchschnitt zweier Einzeluntersuchungen von Mischproben dar, die von jeweils etwa 15 Tieren stammten. Auf die Auswertung von Cystin und Methionin wurde wegen zu großer Hydrolyseverluste verzichtet.

Im Vergleich unserer Resultate ergibt sich für diabetische Tiere eine Erniedrigung des Verhältnisses OH-Prolin/Prolin und OH-Lysin/Lysin gegenüber Kontrollen. Die übrigen Aminosäuren stimmen sehr gut miteinander überein und weisen die für Basalmembrankollagen typischen hohen Gehalte an (3)- und (4)-OH-Prolin, Glycin und OH-Lysin auf.

Ähnliches gilt für die Aminosäurenanalyse des GBM-Kollagens der alten Tiere, die jedoch sehr stark erhöhten Gehalt an (3)-OH-Prolin und OH-Lysin aufweisen. Noch stärker erhöht ist gegenüber Kontrollen das Verhältnis OH-Pro/Pro und OH-Lys/Lys.

	Kontrollen	Diabetes	Alte Tiere	Normal Diabetes BEISSWENGER, 1976	
3-OH Prolin	9	7	27	10	9
4-OH Prolin	72	59	79	79	77
Asparaginsäure	79	73	57	68	68
Threonin	38	40	35	41	42
Serin	43	42	47	56	57
Glutaminsäure	89	93	83	100	100
Prolin	82	78	76	61	64
Glycin	195	196	220	202	193
Alanin	76	75	61	57	54
Valin	57	60	47	38	39
Cystein	§	§	§	19	20
Methionin	§	§	§	14	12
Isoleucin	45	43	36	68	68
Leucin	73	73	64	68	68
Tyrosin	9	8	11	18	17
Phenylalanin	34	34	31	29	29
OH-Lysin	19	16	28	23	23
Lysin	45	47	34	26	26
Histidin	17	18	18	18	18
Arginin	47	48	49	46	44
OH-Pro/Pro	0, 98	0, 84	1, 39	1, 44	1, 37
OH-Lys/Lys	0, 42	0, 34	0, 82	0, 88	0, 88

Tab. D 17 : Aminosäurenanalyse der GBM

§ : Wegen Hydrolyseverlusten wurde auf Auswertung verzichtet

Diabetes: 12 Wochen manifest

Alte Tiere: 2 Jahre

b. Spezifische Aktivität A_{sp} des Prolins

Die Ergebnisse der Untersuchung der A_{sp} des Prolins in der GBM sind in Abb. D 17 wiedergegeben. Nach einem Tag ist die A_{sp} der Kontrollen mit 38,4 nCi/µmol vergleichsweise hoch, nach drei Wochen ist sie auf 7,2 abgesunken. Einen fast parallelen Verlauf nimmt die Kurve für die diabetischen Tiere, die Werte liegen jedoch um etwa die Hälfte niedriger.

Die Resultate der alten Tiere liegen nach einem Tag zwischen denen der diabetischen Tiere und der Kontrolltiere und fallen verhältnismäßig wenig auf 8,3 nCi/µmol ab.

Aus dem Abfall der A_{sp} zwischen einem Tag und drei Wochen läßt sich die Halbwertszeit der Nicht-Kollagen-Proteine abschätzen. Sie beträgt für Kontrollen weniger als 7 Tage, ebenso für Diabetes und für alte Tiere etwa 10 Tage.

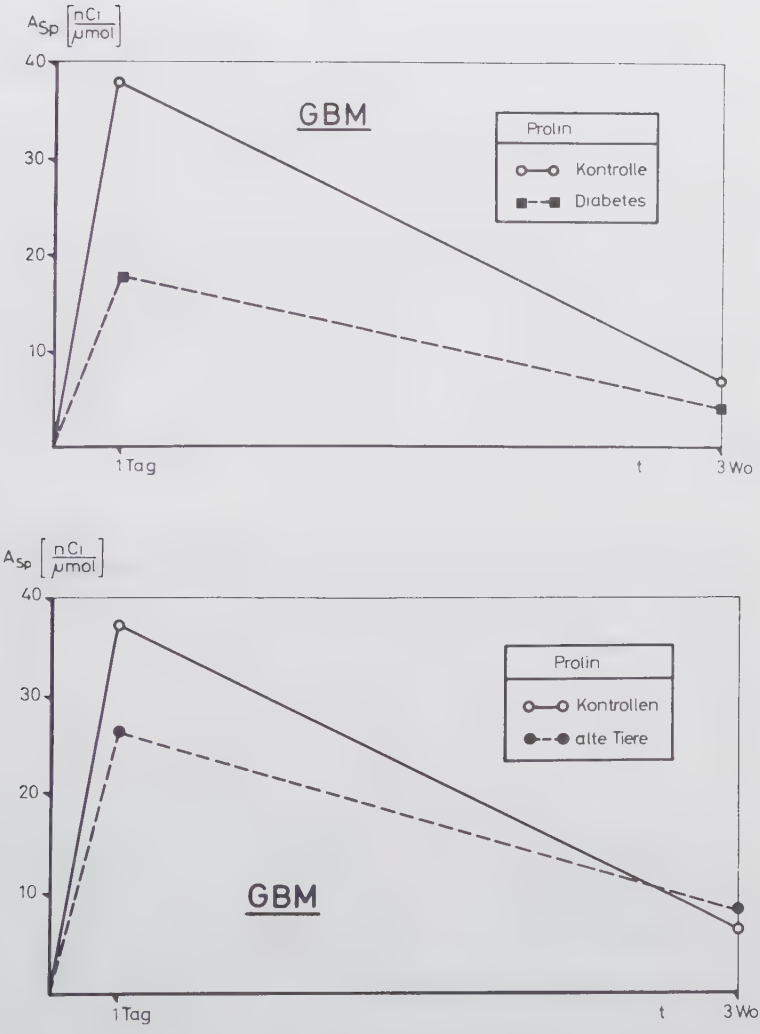


Abb. D 17 : Spezifische Aktivität A_{sp} des Prolins in GBM

c. Spezifische Aktivität des OH-Prolins

Die in Abb. D 18 graphisch dargestellte A_{sp} des OH-Prolins ist nach einem Tag bei allen Gruppen nur etwa ein Zehntel so groß wie die des Prolins. Bei den Kontrolltieren liegt sie nach einem Tag bei 3,65 nCi/µmol, um bis nach drei Wochen auf 4,8 nCi/µmol anzusteigen.

Die Werte der diabetischen Tiere liegen nach einem Tag mit 2,59 nCi/µmol tiefer als die der Kontrollen, sie steigen ebenfalls bis nach drei Wochen an auf 3,0 nCi/µmol.

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die A_{sp} der alten Tiere, hier findet der relativ stärkste Anstieg von 2,56 auf 3,94 nCi/µmol statt. Allgemein liegen die 3-Wochen-Werte in der Größenordnung des Prolins.

Unter Benutzung des Wertes nach drei Wochen ergibt sich unter der Voraussetzung, daß die Kurven noch im ansteigenden Ast sind, mit Hilfe der vereinfachten Formel aus Kap. B.III.3. für die HWZ der Kontrollen 480 Tage, der Diabetiker 580 Tage, der Alten Tiere 670 Tage.

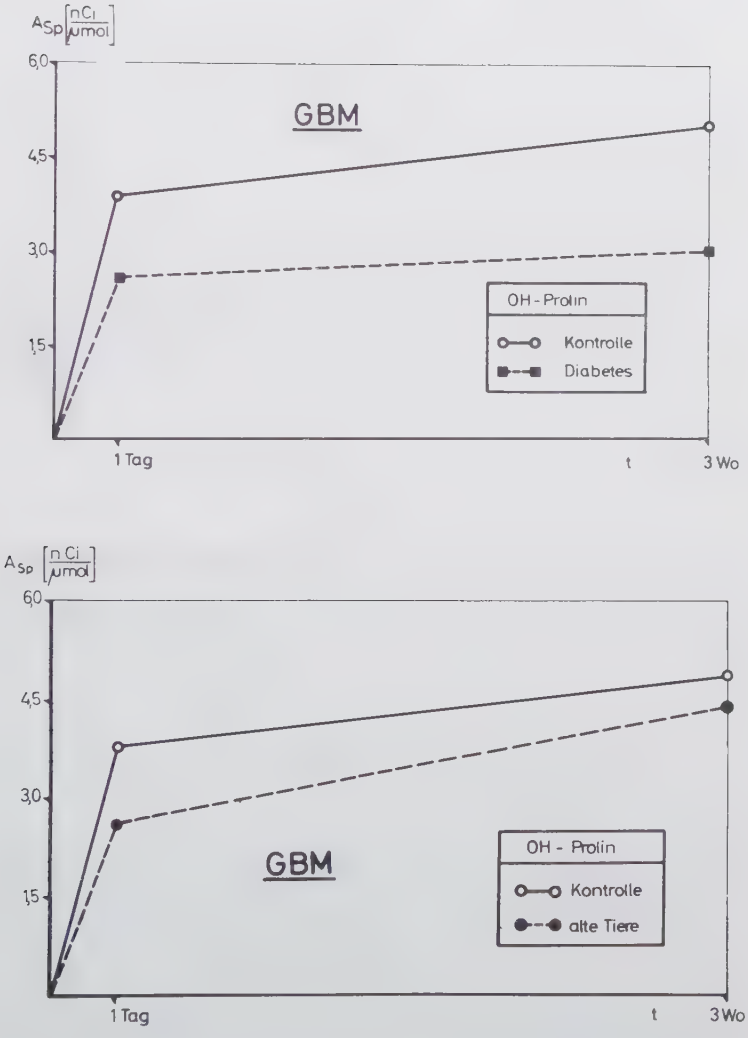


Abb. D 18 : Spezifische Aktivität A_{sp} des OH-Prolins in GBM

E. DISKUSSION

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, ist die Pathogenese der diabetischen Glomerulosklerose (GS) noch weitgehend ungeklärt. Insbesondere bleibt die Frage nach dem formal-pathogenetischen Mechanismus noch offen. Zur Klärung bieten sich folgende Untersuchungsmethoden an:

a) Bestimmung der Syntheseaktivität IN VITRO entweder direkt durch Messung des Einbaus von radioaktiven Markern oder indirekt über die Aktivität der an Synthese oder Abbau beteiligten Enzyme.
b) Ermittlung der Umsatzparameter der GBM durch Markierung IN VIVO.
c) Biochemische Analyse der GBM.

In dieser Arbeit wurden die beiden letztgenannten Wege beschritten. Obwohl für alle drei Untersuchungsmöglichkeiten bereits Ergebnisse in der Literatur vorliegen (s. Kap. B.), hätten allein die Widersprüche der Resultate bezüglich

a) der Aminosäurenzusammensetzung,
b) der Frage der Syntheseerhöhung und
c) einer möglichen Abbauhemmung

die Wiederholung der Ergebnisse gerechtfertigt. Eine in vivo-Studie, wie sie in der Form dieser Arbeit vorliegt, wurde jedoch unter dem besonderen Aspekt der diabetischen GS und der Alters-GS unseres Wissens nach noch nicht in Angriff genommen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Umsatzbestimmungen an kollagenhaltigen Strukturen mit Hilfe von radioaktiv markiertem Prolin bieten gegenüber der Verwendung anderer Aminosäuren den Vorteil der Spezifität des OH-Prolins für Kollagen, denn OH-Prolin kommt bekanntlich ja nur in Kollagen vor. Auf diese Weise konnte schon

der Turnover zahlreicher Bindegewebsstrukturen in verschiedenen Spezies ermittelt werden (WOESSNER 1968). Auch für die GBM bietet sich aufgrund ihres Kollagengehalts OH-Prolin als Leitsubstanz an.

I. Vorversuche

Jede in vivo-Untersuchung beinhaltet jedoch die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse durch verschiedene Parameter wie Alter der Versuchstiere, Diabetesmodell etc., auf die bereits wohl einige der oben genannten Widersprüche zurückzuführen sind. Ihr Einfluß wurde vor Beginn der eigentlichen Hauptuntersuchungen teilweise abgeklärt. Zunächst wurde das von uns verwendete ^{3}H-Prolin auf dessen Eignung als Tracersubstanz geprüft.

-- ^{3}H-PROLIN ALS MARKERSUBSTANZ

Durch Doppelmarkierungen mit ^{14}C- und ^{3}H-Prolin konnte in den Vorversuchen gezeigt werden, daß der Ersatz des ^{14}C-Prolins durch kostengünstigeres ^{3}H-Prolin möglich ist, ohne die Aussagekraft der Ergebnisse zu beeinflussen. Weder bei der Resorption nach i.p. Injektion noch bei der Metabolisierung bestehen wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tracersubstanzen. Der nach der Peptidsynthese in den Schwanzsehnenfibrozyten erfolgende Hydroxylierungsvorgang ist ebenfalls von der Art des Nuklids unabhängig, d.h. bei Benutzung von ^{3}H-Prolin als Marker geht während der Hydroxylierung keine Aktivität verloren.

Einige mögliche Fehler in der Methodik, die sich aus der Verwendung des ^{3}H-Prolins ergeben hätten können, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Es wurde nachgewiesen, daß ^{3}H-Prolin in seiner Aktivität während der für die Aufbereitung der Proben unumgänglichen Säurehydrolyse konstant bleibt. Die von uns gewählte intraperitoneale Injektionsart birgt die Gefahr der Fehlinjektion ins Darmlumen. Durch einfache Blutabnahme nach einem Tag und Bestimmung der nichtflüchtigen Aktivität kann diese jedoch erkannt, ausgesondert und damit Fehlinterpretationen bei Mischproben vermieden werden.

-- FREIES PROLIN IM SERUM : VORLÄUFERSITUATION

Eine weitere wesentliche Fehlerquelle bei der Berechnung und Bestimmung von Halbwertszeiten ergibt sich aus der nach Injektion stattfindenden Vermischung des Markers mit dem inaktiven Prolinpool im Organismus. Die Überprüfung des sich an die Injektion anschließenden Verlaufs der spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum ist für die Berechnung von Umsatzparametern von Proteinpools Voraussetzung. Die sich dabei ergebenden starken interindividuellen Schwankungen in der absoluten Höhe der spez. Aktivität sind in der Hauptsache auf große Unterschiede im Gehalt des freien, inaktiven Prolins im Serum zurückzuführen, die auch von SODEK (1977) gefunden wurden. Da die von uns gemessenen Serumproben Mischproben von 20 Ratten darstellen, ist der entstandene Fehler durch individuelle Streuung sicher gering. Dennoch bestehen in der Bestimmung des Gehalts des freien Prolins im Serum erhebliche methodische Schwierigkeiten, die in der Hauptsache in der Deproteinisierung des Serums begründet sind. Sie bedingen wohl auch die stark unterschiedlichen Angaben in der Literatur. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für den Prolingehalt des Rattenserums liegen am unteren Ende der Skala und damit auf der sicheren Seite. Die Streuung der A_{sp} im Serum sollte im Zusammenhang mit den nicht unerheblichen Unterschieden in der A_{sp} des Prolins in der Leber gesehen werden. Möglicherweise bedingen unterschiedlich starke Verdünnung des Tracers bereits ein unterschiedlich großes Tracerangebot für alle Zellen und damit Schwankungen, die nur durch die Verwendung eines entsprechend großen Kollektivs ausgeglichen werden können.

Bei den von uns untersuchten Versuchsgruppen: Kontrollen, Diabetische Tiere und Alte Tiere ergaben sich keine prinzipiellen Unterschiede im Kurvenverlauf der Serumprolinaktivität (Abb. D 3). Allerdings ist bei der "Diabetes"-Gruppe das Tracerangebot nach längeren Zeiten, die für die Frage der Wiederverwendung entscheidend

sind, geringer. Dies ist durch einen starken Auswascheffekt infolge Polydipsie und Polyurie bedingt. Der initial etwas spitzere Verlauf der Kurve bei diesem Kollektiv könnte durch eine schlechtere Metabolisierung des injizierten Prolins bei der ersten Leberpassage entstanden sein, wofür auch die wesentlich erniedrigten Werte der spezifischen Aktivität in der Leber sprechen.

Der Verlauf der Serumprolinkurve ist für alle Versuchsgruppen zwar prinzipiell ähnlich (Abb. D 3), individuelle Unterschiede im Verlauf sind jedoch für den Einbau des Markers in verschiedene Proteinpools entscheidend. Dabei sind zwei Abschnitte des Kurvenverlaufs zu unterscheiden:

1. Der initial sehr hohe Peak der spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum,
2. Das sich daran anschließende, relativ lange Verweilen der Tracersubstanz im Serum, das durch Freisetzung aus Proteinpools unterschiedlich langer HWZ bedingt ist.

Trotz der vergleichsweise niedrigen spezifischen Aktivität des freien Prolins im Serum nach längeren Zeiten, muß diese im Zusammenhang mit den spezifischen Aktivitäten gesehen werden, die sich in Proteinen niedriger HWZ ergeben. So ist sie nach drei Wochen im Serum noch etwas höher als in der GBM und noch fast 100-mal höher als in SSK.

Der erste, "pulse period" genannte Abschnitt, ist für einen raschen Anstieg der Aktivität, der dem Integral der Serumprolinkurve folgt, in den Proteinen verantwortlich. In dieser "pulse period" ist insbesondere für Gewebe niedriger Neusyntheserate entscheidend, daß den entsprechenden Zellen auch tatsächlich der Tracer zur Verfügung steht. Ein unterschiedlicher Durchblutungszustand und damit ein vom zentral gemessenen Serumprolinverlauf unterschiedliches Angebot bedingt eine Fehlinterpretation der Ergebnisse. Die Aufnahme der freien Aminosäuren in die Kollagen-produzierenden Zellen erfolgt normalerweise ungehindert. In dieser Arbeit wurde vorausgesetzt, daß die A_{sp} innerhalb der Zelle am Ort der Proteinsynthese

mit der extrazellulären übereinstimmt.

Der zweite Abschnitt im Verlauf der A_{sp} des Prolins im Serum kann mit einer Dauerinfusion sehr geringer Konzentration verglichen werden, denn durch Freisetzung aus den Proteinpools des Organismus (Wiederverwendung) bleibt die A_{sp} im Serum sehr lange fast konstant. Dieser Verlauf verhindert die einfache Bestimmung der HWZ aus dem Abfall der A_{sp} und muß entweder mathematisch berücksichtigt oder durch Überladung des Organismus mit inaktivem Prolin verhindert werden (NISSEN et al. 1977).

-- STREUUNG DER ERGEBNISSE

Das Angebot des Markers am Ort der Proteinsynthese, das primär vom Durchblutungszustand des Gewebes abhängt, bedingt also eine nicht unerhebliche Streuung der Versuchsergebnisse und eine Einschränkung der Aussage. Aufgrund der relativ aufwendigen Untersuchungstechnik sowie der mit der Isolierung des GBM-Materials verbundenen Mengenprobleme (aus einem Rattennierenpaar lassen sich nur etwa 0,3 mg GBM-Material gewinnen) haben wir in dieser Arbeit auf die Untersuchung gepoolter Proben zurückgegriffen. Damit muß zwangsläufig auf die Angabe der Streuung und der Signifikanz verzichtet werden. Um diese abzuschätzen, wurden am SSK von fünf Einzeltieren Einzeluntersuchungen durchgeführt. Deren Ergebnisse sind jedoch nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in der Niere übertragbar. Die gefundenen großen Streuungswerte (Tab. D 16) insbesondere der A_{sp} des OH-Prolins scheinen nämlich ein besonderes Problem des SSK zu sein. Dies mag daran liegen, daß hier wenig konstante Durchblutungsverhältnisse herrschen. HARRISON und ARCHER (1976) fanden darüber hinaus Unterschiede in der Alterung der Fasern, die aus Schwanzwurzel stammen gegenüber denen der Schwanzspitze. Sie führen dies auf verschiedene Temperaturen, damit verbundene erniedrigte oder erhöhte Enzymaktivitäten und Durchblutungsunterschiede zurück. Die in weiteren Versuchen gefundene, wesentlich geringere Streuung beim Hautkollagen

(RAUSCHER und ROMEN, persönliche Mitteilung) spricht dafür, daß diese Probleme auf den Bereich des SSK beschränkt bleiben.

Weiterhin werden durch die Verwendung von Kollektiven von mindestens 15 Tieren die entstehenden Fehler gering gehalten und die Aussagekraft der Ergebnisse in hinreichendem Umfang wieder hergestellt.

-- DIABETES MELLITUS-MODELL

Eine nicht unerhebliche interindividuelle Streuung ergibt sich natürlich bereits aus dem experimentellen Modell des Diabetes mellitus. Die Induktion diabetischer Stoffwechsellage mittels Streptozotocin ist dennoch zur Zeit wohl das brauchbarste Diabetes-Modell. Es wurde bislang keine direkte toxische Wirkung des Streptozotocin auf die Niere wie beim Alloxan beschrieben (vgl. RUDAS 1972). Durch die Tatsache, daß zu Beginn der Markierungen, also des eigentlichen Versuchs, der Diabetes mellitus bei den entsprechenden Versuchsgruppen bereits 8 Wochen manifest war, kann zudem eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die akute Stoffwechselumstellung ausgeschlossen werden. Allerdings war der Einfluß der diabetischen Stoffwechsellage mit teilweise sehr hohen Blutzuckerwerten (über 500 mg%) auf den Allgemeinzustand und Wachstum der Tiere erheblich. Die von uns gefundene starke Erniedrigung der spezifischen Aktivität des Prolins in der Leber nach einem Tag (Tab. D 14) weisen auf eine allgemein eingeschränkte Proteinsynthese hin, möglicherweise eine Folge des Insulinmangelzustands. Ebenso fanden wir eine stärkere Streuung der Nichtkollagenprotein (NCP)-Synthese im SSK. Die immer stärker werdenden Unterschiede im Allgemeinzustand der Tiere erschweren die Durchführung und Aussagekraft von Langzeitversuchen.

II. Normalbefunde

-- SEHNE ALS REFERENZKOLLAGEN

Im Mittelpunkt der Fragestellung dieser Arbeit stand die GBM. Als Referenzkollagen bezüglich Reinheit der Isolierung, Auswirkung von Verunreinigungen und Einbau von OH-Prolin und Prolin bot sich das Typ I - Kollagen der Schwanzsehne aufgrund problemloser Isolierung in quantitativer und qualitativer Hinsicht an.

So zeigen die Resultate der Gesamtaminosäurenanalyse des SSK (Tab. D 15) eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Literatur (vgl. PIEZ et al., 1963) und beweisen somit die hohe Genauigkeit der Analyse. Die wesentlich höhere A_{sp} des Prolins verglichen mit der OH-Prolinaktivität nach einem Tag läßt vermuten, daß hier nur geringe Verunreinigungen bestehen, die jedoch einem sehr viel höheren Proteinumsatz unterliegen.

Bevor nun auf die eigentlichen Ergebnisse der Umsatzparameter eingegangen werden kann, sollen diesen die theoretisch zu erwartenden Werte vorangestellt werden, die sich aus der Berechnung der mit Hilfe der in B.III.3. abgeleiteten Beziehungen ergeben.

Wie aus Abb. E 1 zu ersehen ist, lassen sich daraus folgende Erkenntnisse gewinnen:

1. Der sich ergebende Kurvenverlauf für die A_{sp} eines homogenen Proteinpools ist so zu charakterisieren:
   a) Die FORM der Kurve ergibt sich aus der jeweiligen HWZ des Proteinpools (Abb. E 1 a, c, e).
   b) Die absolute HÖHE der Werte ergibt sich aus der Neusyntheserate. Unter Voraussetzung des steady-state sind diese voneinander abhängig: Je kürzer die HWZ, desto größer ist die Neusyntheserate.
2. Die theoretische Berechnung erlaubt so eine Vorhersage der Lage der Maxima und die richtige Wahl der Versuchspunkte.

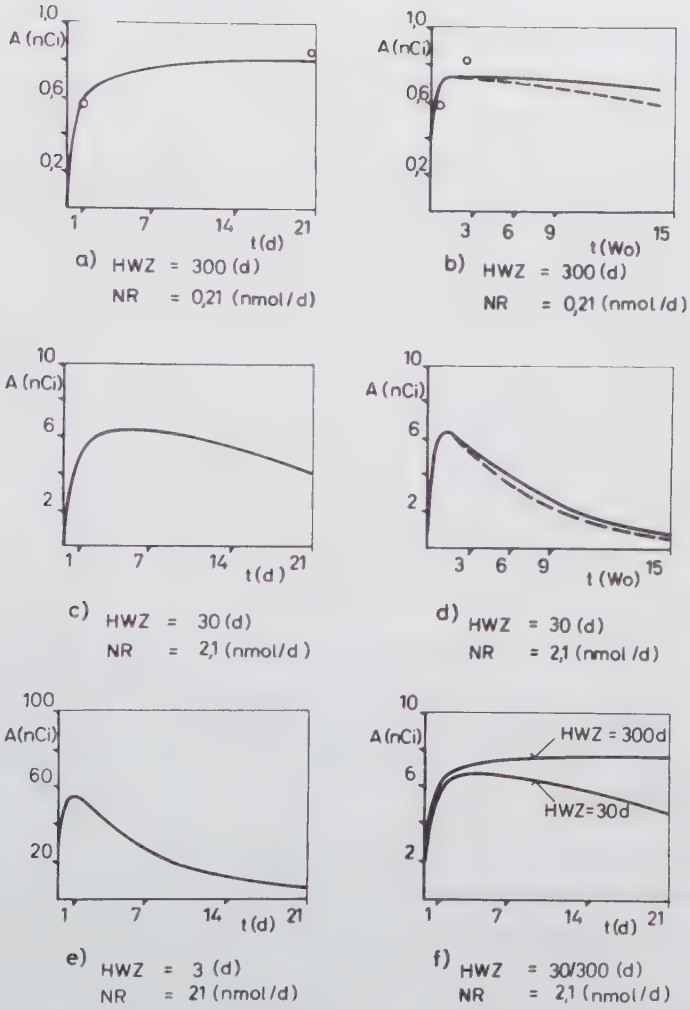


Abb. E 1 : Ergebnisse der theoretischen Berechnungen

HWZ	Maximum
3 d	16 h
30 d	4 d
300 d	3 Wochen

3. Die in Abb. E 1 b und d gestrichelt eingezeichneten Kurven zeigen den Verlauf ohne Berücksichtigung der Wiederverwendung. Der Einfluß erscheint zunächst gering, hätte man jedoch die HWZ rein aus dem abfallenden Teil der Kurve bestimmt, so ergäbe sich beispielsweise eine HWZ von 38 Tagen anstatt korrekt von 30 Tagen.

4. Die aus den reinen Synthesebedingungen (1-Tageswert) errechnete HWZ hat zwangsläufig einen sehr flachen Verlauf der Kurve zur Folge. Er schließt, wie aus Abb. E 1 a zu erkennen ist, ein Maximum zwischen 1 Tag und 3 Wochen aus. Unsere tatsächlich gefundenen Werte (in der Kurve E 1 a sind die Normalbefunde der GBM als Punkte eingezeichnet) bestätigen dies.

5. In Abb. E 1 f ist der Kurvenverlauf für eine Struktur wiedergegeben, die sich aufgrund verminderten Abbaus bei gleichbleibender Syntheserate im Wachstum befindet. Dies trifft beispielsweise für sehr junge Tiere zu. Die untere Kurve entspricht dem Gleichgewichtszustand.

6. Die beiden rechten Kurven E 1 b und d sagen die Werte der A_{sp} nach drei Monaten voraus, die in dieser Arbeit nicht experimentell ermittelt wurden. Sollten diese im Experiment wesentlich niedriger liegen, so trifft die in der Berechnung getroffene Voraussetzung statistischen Abbaus der GBM-Bausteine nicht zu. Vielmehr könnte sich dann eine Treppenkurve der Aktivität durch einen Durchwanderungseffekt ergeben, wie in Kap. B.III.3. bereits angedeutet wurde.

Diese Überlegungen bilden die Grundlage für das Verständnis unserer experimentellen Ergebnisse, die in der Folge besprochen werden sollen.

-- OH-PROLIN - AKTIVITÄT

Wie bereits oben erwähnt, stellt der zeitliche Verlauf der OH-Prolinaktivität ein Maß für den Kollagenumsatz dar. Die von uns ermittelten extrem niedrigen Werte der A_{sp} des OH-Prolins und die damit verbundene extrem lange Halbwertszeit stimmen mit den Ergebnissen von NEUBURGER und SLACK (1953) überein, die HWZ für Kollagenstrukturen fanden, die weit über das Lebensalter der Versuchstiere hinausgingen. Die extrem lange HWZ bedingt wiederum, wie im Kap. B.III.4. theoretisch abgeleitet wurde, daß die A_{sp} des OH-Prolins von einem Tag bis drei Wochen noch ansteigt. Die von uns gewählten Meßpunkte erlauben keine Aussage über einen eventuellen Abfall der A_{sp} des OH-Prolins. Dennoch ist ein direkter Vergleich des Verlaufs der einzelnen Versuchsgruppen möglich.

Die Errechnung von HWZ von Strukturen, die extrazellulär liegen, stößt jedoch auf einige grundsätzliche Schwierigkeiten, auf die zunächst eingegangen werden soll.

-- MORPHOLOGISCHE ALTERSUNTERSCHIEDE

Bereits fertig synthetisiertes, unmarkiertes Kollagen kann in wechselnder Menge extrazellulär vorliegen und damit die Werte der A_{sp} entscheidend beeinflussen. Durch lichtmikroskopische Untersuchungen fanden wir, daß die Menge an extrazellulär liegendem Kollagen im Verhältnis zu Fibrozytenzahl und -fläche im Verlauf des steigenden Lebensalters um ca. das Dreifache zunimmt (Tab. D 12). Die Absolutwerte der Fibrozyten scheinen dabei konstant zu bleiben.

-- KOLLAGENVORSTUFEN

Weiterhin muß die aus dem Anstieg der A_{sp} errechnete Neusyntheserate und HWZ nicht unbedingt der tatsächlichen Syntheseaktivität der Fibrozyten entsprechen, da ein noch nicht vernetzter und damit instabiler Teil des Kollagens, die Kollagenvorstufen, wahrscheinlich einer wesentlich schnelleren Kollagenolyse unterliegt. Diese weisen dem-

entsprechend einen wesentlich höheren Umsatz auf und können außerdem isoliert pathologisch verändert sein (NIMNI et al. 1967, KIVIRIKKO 1970, SODEK 1977). Die von KAO et al. (1960) gefundenen HWZ sind durch die von ihnen verwendete Messung der Gesamtaktivität ohne Berücksichtigung der Spezifität des OH-Prolins für Kollagen durch die Mitmessung der Nicht-Kollagen-Proteine (NCP) zwangsläufig scheinbar kleiner als die von uns ermittelten Werte.

-- NCP-UMSATZ

Wie bereits der Vergleich der absoluten Höhe der A_{sp} des OH-Prolins und des Prolins zeigt (Abb. D 15, D 16), ist die getrennte Messung dieser NCP für eine korrekte Aussage unbedingt erforderlich. Die über Prolin nach einem Tag gefundene Aktivität, die von uns als Maß für die Synthese der NCP angesehen wurde, ist zwar verglichen mit anderen Proteinen des Körpers ebenfalls sehr gering, jedoch etwa 10 mal so hoch wie die OH-Prolinaktivität. Sie entstammt einem Proteingemisch von Komponenten unterschiedlich schnellen Umsatzes. Hier gefundene Streuungen sind wechselnden Mengen hochaktiver Proteine zuzuordnen. Nach drei Wochen entspricht die A_{sp} des Prolins der des OH-Prolins und stammt damit wohl zum größten Teil aus Kollagen. Die HWZ der schnellen Komponente ergibt sich unter dieser Annahme zu Werten unter 15 Tagen.

Während man beim SSK davon ausgehen kann, daß Verunreinigungen nur in geringer und in etwa konstanter Menge auftreten, ist jede biochemische Analyse der GBM mit den ihr eigenen Schwierigkeiten der Isolation behaftet. Da bei der Präparation der GBM Fragen bezüglich der Methodik auftauchen, die die Grundaussage entscheidend beeinflussen, soll zunächst auf die Problematik der Präparation eingegangen werden.

-- GBM: PROBLEMATIK DER PRÄPARATION

Die Präparation der Glomeruli nach der Methode von KRAKOWER und GREENSPON (1951) und die damit verbundene Gewinnung der GBM ist durch wechselnde Mengen an Verunreinigungen beeinflußt. Dies erklärt wohl zum größten Teil die unterschiedlichen Werte der Aminosäurenzusammensetzung der GBM in der Literatur (vgl. REDDI 1978).

Die Methodik der Isolation ist in Kap. C.VI. ausführlich dargestellt. Es handelt sich dabei um eine relativ einfache mechanische Trennung der Glomeruli aus dem Nierenparenchym durch Vorzerkleinerung und anschließendes Passieren durch ein Stahlsieb. Verunreinigungen versucht man durch Sieben durch Nylonnetze absteigender Porenweite (80, 48 um) zu entfernen. Nach Zerschlagung der Zellstruktur mittels Ultraschall wird die GBM durch Zentrifugation abgetrennt.

Auch in dieser Arbeit konnten Qualität und Quantität der isolierten Glomerulusfraktionen nicht absolut konstant gehalten werden. Bemerkenswert ist die große Abhängigkeit der Ergebnisse vom Verhältnis der Glomerulusgröße zur Maschenweite der verwendeten Siebe und Netze. Überraschend ist der im Vergleich zur Netzweite sehr große Durchmesser der Glomeruli. So betrug dieser auf dem 48 µm-Netz 107 ± 18 µm, obwohl diese Glomeruli bereits das 80 µm-Netz passiert hatten. Die Glomeruli scheinen also sehr elastisch zu sein und durch die Netze gezwängt werden zu können. Unsere ermittelten Werte für die Glomerulusgröße der Ratten stimmen mit denen der Literatur überein (vgl. BARGMANN 1978).

Da die für die einzelnen Versuchsgruppen erhaltenen Durchmesser natürlich in Zusammenhang mit der Methodik zu sehen sind, sollen im Vorgriff auf die Ergebnisse der diabetischen und alten Tiere, deren Glomerulusbefunde bereits hier besprochen werden. Im Unterschied zu den Beobachtungen von GUNDERSSON und ØSTERBY (1977), aber auch von BUTCHER et al. (1977), konnten wir bei den diabetischen Tieren in dem 11-wöchigen Zeitraum keine Vergrößerung der Glomeruli feststellen. Deutlich erhöht fanden wir dagegen die Größe der Glomeruli der alten Tiere (von 110 ± 18 µm bei Kontrollen auf 151 ± 20 µm

bei alten Tieren), was uns zur Verwendung größerporiger Netze für diese Versuchsgruppe veranlaßte. Der unveränderte Durchmesser nach Diabetisierung mag einerseits eine Besonderheit des Diabetesmodells sein. Die Diskrepanzen dürften aber in erster Linie auf die unterschiedliche Versuchsdauer zurückzuführen sein.

Der größte Unsicherheitsfaktor in qualitativer Hinsicht bei der Isolierung sind neben der Wahl der Porenweite die in Kapitel D II. 2 a erwähnten "Schleier" (Abb. B 8), die wahrscheinlich keine glomeruläre Herkunft haben und Reste von Tubulus-Basalmembranen oder in sehr geringer Menge Bowman'scher Kapseln darstellen. Mengenmäßig sicher zu vernachlässigen sind als solche erkennbare Tubulus-Schläuche. Darüber hinaus bestehen wahrscheinlich nach bisherigen Untersuchungen (KRISKO 1977) keine wesentlichen Unterschiede im Aminosäuremuster der TBM zur GBM, der (3)-OH-Prolingehalt liegt allerdings etwas höher.

Nach unserem Eindruck ist die Menge der Spülflüssigkeit für die Qualität der Präparate entscheidend, sie sollte gegenüber der hier beschriebenen Methodik noch erhöht werden. Selbst größere Beimengungen an tubulärer Basalmembran (TBM) dürften jedoch keinen wesentlichen Einfluß auf die Ergebnisse haben, da deren Umsatzraten wahrscheinlich denen der GBM sehr ähnlich sein werden.

-- ABSICHERUNG DER ERGEBNISSE

Um der Grundaussage dieser Arbeit eine gewisse Unabhängigkeit von der Qualität der Präparation zu geben, wurde sie zunächst in folgenden Punkten in Frage gestellt:

1. Ist die Verwendung nur einer bestimmten isolierten glomerulären Fraktion, die ja nur einen Teil der Glomeruli beinhaltet, gerechtfertigt?
2. Was heißt "Verunreinigung" der Präparationen in bezug auf die A_{sp} des OH-Prolins und des Prolins?

3. Hätte man aufgrund der Spezifität des OH-Prolins für Kollagen nicht ganz auf die Isolierung verzichten können?

Zur Kontrolle wurden bei den Haupt- und Vorversuchen auch die nicht für die Hauptaussage verwendeten Netzauflagerungen weiterverarbeitet und untersucht. Auf den 48 µm Netz fand sich in allen Versuchsgruppen jeweils der höchste (4)-OH-Prolingehalt (= Kollagen) und (3)-OH-Prolingehalt (= BM Kollagen), was die Verwendung dieser Netzfraktionen für die Grundaussage dieser Arbeit rechtfertigt. Dennoch sei erwähnt, daß bei Untersuchung der 80 µm Fraktion sich bei Diabetes und Kontrollen relativ zueinander die gleichen Kurvenverläufe wie bei der 48 µm Fraktionen ergeben hätten (nicht in den Ergebnissen dargestellt). Die in dieser Arbeit getroffene Hauptaussage ist somit in gewissem Umfang von der Genauigkeit der Isolierung unabhängig.

Durch Vergleich der Aminosäurenzusammensetzung der Einzelfraktionen und deren Ergebnisse der A_{sp} ergibt sich, daß Verunreinigungen in den Präparationen mit einer Zumischung sehr aktiver NCP gleichbedeutend sind. Dies äußert sich in starker Erhöhung der A_{sp} des Prolins. Es kann nicht entschieden werden, ob diese Bestandteil der GBM sind oder nicht.

Die A_{sp} des OH-Prolins dagegen wird von Verunreinigungen weit weniger beeinflußt. In einem Proteinhydrolysat, das aus einem Nierenhomogenat ohne Isolierung hergestellt worden war, ist sie nur um 20% niedriger als mit Isolierung - ein Vorteil der Spezifität des OH-Prolins für Kollagen (vgl. Tab. D 11). Gleichzeitig weist dieser Befund aber auch in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem SSK darauf hin, daß das BM-Kollagen aus der Niere - verglichen mit anderen Kollagenen beispielsweise des Nierenstützgewebes - einen relativ höheren Umsatz hat. Die wesentlich niedrigeren Umsatzraten des Nierenstützgewebes geben der Isolation der GBM also sicher ihre Berechtigung.

Die biochemische Analyse des in dieser Arbeit untersuchten GBM-

Materials bestätigt unsere Methodik durch die weitgehende Übereinstimmung mit den Werten aus der Literatur (vgl. SPIRO 1978, REDDI 1978). Der hohe Gehalt an Glycin, (4)-OH-Prolin und Prolin weisen das von uns isolierte Material als Kollagen aus, der große Anteil des an Stellung (3) hydroxylierten Prolins charakterisiert Kollagen des Typs IV. BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1978) heben die Bedeutung des molaren Verhältnisses von OH-Prolin zu OH-Lysin als Charakteristikum der verschiedenen Kollagentypen hervor. Wir konnten in dieser Arbeit ein Verhältnis OH-Pro/OH-Lys von 3, 5 finden, was bei BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN als kennzeichnend für Kollagen Typ IV gilt.

-- KOLLAGEN-PROTEINUMSATZ DER GBM

Nachdem gezeigt wurde, daß unsere Isolationsmethode dem heute üblichen Standard entspricht, kann nach Ausschluß dieser Unsicherheit auf die eigentlichen Ergebnisse unserer Umsatzmessungen eingegangen werden.

Der Verlauf der spezifischen Aktivität des OH-Prolins in der GBM entspricht den Erwartungen für einen Eiweißpool langsamer Umsatzraten (Abb. D 18). Die absolute Höhe der gemessenen Werte ist für OH-Prolin, aber auch für Prolin um ca. den Faktor 10 größer als im SSK. Unsere Werte sind nach Bezug auf eine einheitliche Aktivierungsdosis für die Kontrollgruppe in der gleichen Größenordnung wie die von CHOW und DRUMMOND (1969) und die von LAZAROW und SPEIDEL (1964). Beide Untersuchergruppen finden relativ zum Prolin höhere Werte der A_{sp} des OH-Prolins als in dieser Arbeit gemessen, was jedoch auf das unterschiedliche Alter der Versuchstiere zurückzuführen ist. Auch SPIRO (1976) gibt sehr niedrige Werte für die A_{sp} des OH-Prolins an und schließt daraus auf einen sehr langsamen Turnover der GBM.

Wie in den Ergebnissen dargestellt, fanden wir die spezifische Aktivität des OH-Prolins nach drei Wochen im Vergleich zum Eintageswert

noch etwas erhöht. Der von LAZAROW und SPEIDEL (1964) gemessene, bereits nach 30 Tagen deutlich erkennbare Abfall der Kurve dürfte auf einen nicht berücksichtigten Verdünnungsfaktor durch Wachstum zurückzuführen sein, denn die Versuchstiere von LAZAROW und SPEIDEL befanden sich mit einem Alter von 30 bis 60 Tagen noch in einer Phase starken Wachstums.

Unter den in dem allgemeinen Teil dieser Arbeit genannten Vereinfachungen ergibt sich für das GBM-Kollagen eine Abschätzung der Halbwertszeit aus den Synthesebedingungen von 480 Tagen bei Kontrolltieren. Wie in Kap. B.III.4. gezeigt werden konnte, ist für einen reinen Eiweißpool mit solch langen HWZ der Kurvenverlauf nicht anders zu erwarten als es dem gemessenen entspricht.

-- NCP-UMSATZ DER GBM

Ganz anders verhält sich wiederum die A_{sp} des Prolins. Diese ist wie im SSK nach einem Tag etwa 10 mal so groß wie die des OH-Prolins. Dies läßt auf einen gewissen Grad an Verunreinigungen durch Proteine schließen, die sehr viel schneller umgesetzt werden als Kollagene. Diese NCP sind vermutlich jedoch nicht Bestandteile der GBM, denn selbst wenn die GBM zu einem so großen Anteil aus NCP besteht, wie es die Arbeitsgruppe um SPIRO (vgl. SPIRO 1976) vermutet, so ist es doch zumindest unwahrscheinlich, daß diese NCP als Bestandteile einer gemeinsamen Struktur einen stark vom Kollagen abweichenden Turnover haben. Ebenso kann es sich nicht um Kollagenvorstufen handeln, da die Hydroxylierung nach einem Tag sicher abgeschlossen ist und somit OH-Prolin und Prolin gleichsinnig erhöht sein müßten. Die von uns gemessene Prolinaktivität stammt also von einem Proteingemisch aus mindestens zwei Komponenten, von denen die schnellere eine Halbwertszeit von weniger als 7 Tagen besitzt. Nach 3 Wochen ist die Aktivität der schnellen Komponente wieder abgeklungen, die spezifische Aktivität des Prolins entspricht fast der des OH-Prolins und damit der des Kollagens.

III. Diabetes

Die bisher besprochenen Normalbefunde bilden die Voraussetzung für das Verständnis der pathologischen Veränderungen des Kollagens in der GBM und in der Schwanzsehne beim Diabetes, die ja im eigentlichen Mittelpunkt unseres Interesses standen. Der direkte Vergleich der Ergebnisse ist jedoch nur möglich, wenn einige für diese Versuchsgruppe spezifische Probleme berücksichtigt werden.

-- SPEZIELLE PROBLEME BEI DER DIABETISCHEN VERSUCHSGRUPPE

Der Verlauf der A_{sp} des freien Prolins im Serum der diabetischen Versuchstiere, der sich insbesondere für längere Zeiten von dem der Kontrolltiere unterscheidet, kann in den Berechnungen der HWZ berücksichtigt werden. Schwieriger ist die Abschätzung des Allgemeinzustands der diabetischen Tiere. Eine allgemeine Einschränkung der Proteinsynthese bei Streptozotocin-Diabetes lassen folgende Befunde vermuten:

1. Die nach einem Tag in der Leber gefundene A_{sp} des Prolins ist nur etwa halb so groß wie die der Kontrolltiere (Abb. D 14).
2. Diabetische Versuchstiere bleiben hinter den Kontrollen in Gewichtsentwicklung und Allgemeinwachstum zurück (Abb. D 5).
3. Die Proteinsynthese in den Schwanzsehnenfibrozyten steigt in etwa linear mit dem Körpergewicht der Ratten. Tiere mit auffallend schlechtem Allgemeinzustand zeigen die niedrigsten Einbauraten (Abb. D 14).

Die Gründe dafür sind in dem absoluten Insulinmangelzustand zu suchen, in dem sich die Tiere befanden. Das Unterlassen jeglicher therapeutischer Maßnahmen bedingte teilweise exzessiv hohe Blutglucosewerte und einen fast komatösen Zustand der Versuchstiere.

-- BIOCHEMIE BEI DIABETES

Die obengenannten Probleme beeinflussen zwar stark die Einbauraten; die Aminosäurenanalyse, die zunächst im Hinblick auf eine eventuelle qualitative Veränderung des Kollagens durchgeführt wurde, dürfte davon jedoch weniger betroffen sein. Beim Diabetes erwies sich das SSK in seinem Aminosäurenspektrum als im wesentlichen unverändert. In der GBM konnten wir keine Erhöhung (wie man bei einer Glomerulo-"sklerose" im Sinne vermehrten Kollagengehalts eigentlich erwartet hätte), sondern eher eine leichte prozentuelle Erniedrigung des (3)- und (4)-OH-Prolins und des OH-Lysins feststellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten von BEISSWENGER (1976) überein, der ebenfalls die GBM von streptozotocin-diabetischen Ratten untersuchte. Die Befunde von SPIRO (1971), BEISSWENGER und SPIRO (1973) und KEFALIDES (1973), die eine Erhöhung des OH-Lysin/Lysin - Verhältnisses beschreiben, beziehen sich alle auf die GBM menschlicher Diabetiker. Sie stellen aber ebenfalls einen gleichbleibenden Gehalt an OH-Prolin fest. Die Werte des OH-Prolingehaltes pro Glomerulus sind bei Diabetes auch unverändert. KALANT et al. (1977) kommen zu dem gleichen Ergebnis und schließen daraus, daß die Verdickung der GBM zumindest bei experimenteller diabetischer GS nicht mit einer Erhöhung des Kollagengehaltes einhergeht.

-- KOLLAGENUMSATZ DER SEHNE

Der Verlauf der spezifischen Aktivität des OH-Prolins im SSK entspricht beim Diabetes nicht den theoretischen Erwartungen (vgl. Kap. B.III.3., E I.). Der Anstieg der obengenannten Kurve auf fast das 7-fache ist nicht mit einem 2-Pool-Modell zu erklären, wenn man berücksichtigt, daß das freie Serumprolin von einem Tag bis drei Wochen nur um ca. 13 % ansteigt.

Die Diskrepanz des gemessenen Kurvenverlaufs mit den theoretischen Erwartungen könnte auf eine besonders starke Beeinträchtigung der Proteinsynthese oder der Vaskularisierung in dieser Versuchsgruppe zurückzuführen sein. Dafür sprechen der gleichsinnig erniedrigte Pro-

linwert sowie der Vergleich mit den Werten der GBM-Fraktion, die auch beim Diabetes den Erwartungen entsprechen. Möglicherweise könnte jedoch eine spezifische Alteration des LÖSLICHEN Kollagens, also einer Vorstufe mit wesentlich höherem Umsatz, die besonders niedrigen Ein-Tages-Werte beim Diabetes erklären. Da in der hier vorliegenden Arbeit nicht in einzelne Kollagenfraktionen unterschieden wurde, würde eine isolierte Veränderung der Kollagenvorstufen sich stark auf den Ein-Tages-Wert auswirken, jedoch nur wenig auf den 3-Wochen-Wert. GOLUB et al. (1978) fanden veränderte physikalische und biochemische Eigenschaften speziell des löslichen SSK bei experimentell induzierten Diabetes mellitus. Die in dieser Arbeit nachgewiesene relativ große Abhängigkeit der Proteinsynthese in den Schwanzsehnenfibrozyten vom Gewicht der diabetischen Tiere und deren Gewichtszu- oder -abnahme läßt auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Proteinsynthese oder der Vaskularisierung durch den stark alterierten, teilweise fast komatösen Zustand der Tiere schließen.

-- UMSATZ DER GBM BEIM DIABETES

Die Kenntnis des Verhaltens des Referenzkollagens aus der Sehne erweist sich bei der Beurteilung des Verlaufs der A_{sp} in der GBM beim Diabetes als hilfreich. Dieser zeigt ebenfalls eine deutliche Verminderung des Eintageswertes der A_{sp} des OH-Prolins gegenüber Kontrollen. Noch stärker, nämlich um mehr als 50%, ist der Wert der Prolinaktivität reduziert. Bei der Versuchsgruppe der diabetischen Tiere liegt offenbar, wie bereits oben unter Berücksichtigung der Leberwerte ausgeführt wurde, eine allgemeine Störung der Proteinsynthese vor. Diese ist entweder durch das experimentelle Modell des Diabetes mellitus oder - wahrscheinlicher - durch den stark beeinträchtigten Allgemeinzustand der Tiere bedingt. Eine eindeutige Aussage zur Frage der Syntheseerhöhung kann dadurch in dieser Arbeit nicht getroffen werden. Die Befunde von WEBER und ROMEN (1978) weisen darauf hin, daß nach Diabetisierung der Tiere eine Art "Kon-

servierung" der bestehenden Verhältnisse eintritt. Durch die bereits erwähnte Einschränkung der Proteinsynthese werden die ohnehin geringen Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung der GBM noch kleiner. Dies hätte sich bei Verwendung einer Versuchsgruppe mit etwas niedrigerem Serumglucosewert evtl. vermeiden lassen.

Auch ein gesteigerter intrazellulärer Abbau kann sich in einem gedrosselten Einbau einer radioaktiven Markersubstanz äußern. Diese zunächst widersprüchlich erscheinende Aussage erklärt sich aus der Tatsache, daß bei gesteigertem intrazellulärem Abbau die A_{sp} des Markers innerhalb der Zelle erniedrigt wird und damit am Ort der Proteinsynthese ein vermindertes Tracer-Angebot herrscht. Hiermit könnten über die antikatabole Wirkung des Insulins die stark erniedrigten Einbauwerte insbesondere der Leber erklärt werden (KHAIRALLAH und MORTIMORE, 1976).

Sieht man die spezifische Aktivität des Prolins nach einem Tag als Maß für die Proteinsynthese und damit auch für die Kollagenpeptidkettensynthese an, so ist die Hydroxylierungsrate relativ erhöht. Die in vitro von einigen Autoren (RISTELI 1976, GRANT et al. 1976) gefundene Erhöhung der Prolylhydroxylase bei Diabetes konnte von anderen nicht bestätigt werden (KIVIRIKKO 1976, COHEN und KHALIFA 1977). LAZAROW und SPEIDEL (1964) finden einen dem unseren ähnlichen Kurvenverlauf. HAUSS et al. (1964) untersuchten den Stoffwechsel der Mucopolysaccharide bei alloxan-diabetischen Ratten und fanden den Einbau von ^{35}S ebenfalls vermindert.

Der Anstieg der A_{sp} des OH-Prolins von einem Tag bis drei Wochen entspricht im Gegensatz zum Schwanzsehnenkollagen dem Vorläuferangebot. Dies mag daran liegen, daß hier wesentlich konstantere Durchblutungsverhältnisse herrschen. Wie bei den Kontrolltieren ist auch bei Diabetes keine direkte Aussage über eine eventuelle Abbauhemmung möglich, da die von uns gewählten Versuchspunkte noch im Kurvenanstieg liegen. In Anbetracht des, verglichen mit den Kontrollen, niedrigeren Vorläuferangebots im Zeitraum zwischen einem Tag und drei Wochen sowie einer wahrscheinlich erniedrigten Synthese sind die Drei-Wochenwerte für Diabetes jedoch relativ höher als die der Kon-

trollen und lassen somit auf eine Abbauhemmung der GBM bei dieser Versuchsgruppe schließen.

Die von ROMEN und MORATH (1979) gefundenen Zuwachsraten der GBM nach Mesangiumblockade deuten auf eine HWZ der GBM hin, die der in dieser Arbeit gefundenen entspricht (HWZ bei Diabetes auf 560 Tage verlängert). Auf eine Abbauhemmung läßt auch der Befund von FUSHIMI und TARUI (1978) schließen, daß die Aktivität von Glykosidasen, am Abbau von GBM - Material beteiligten Enzymen, bei experimentell induziertem Diabetes stark erniedrigt ist. In diesem Zusammenhang sei auf die Veränderungen des Mesangium bei Streptozotocin-Diabetes hingewiesen.

WEHNER und MAJOREK (1975) konnten beim Meerschweinchen eine Zunahme der Mesangialzellen schon nach kurzer Diabetesdauer feststellen. Da dieser Struktur die Hauptaufgabe im Abbau der GBM zukommt, kann eine Alteration des Abbaus beim Diabetes als wahrscheinlich angesehen werden, zumal eine mesangiale Dysfunktion bei experimentellem Diabetes bereits berichtet wurde (WARDLE 1975).

IV. Wachstum und Alter

Die morphologische Ähnlichkeit der Dickenzunahme der GBM im Alter mit den Befunden bei diabetischer GS läßt zunächst einen ähnlichen pathogenetischen Mechanismus vermuten. Einen Teil dieser Arbeit stellt den Versuch dar, zu dieser Frage neue Erkenntnisse zu gewinnen. Fast zwei Jahre alte Ratten wurden in der gleichen Weise untersucht wie die 19 bis 20 Wochen alten diabetischen und Kontrolltiere.

-- VERÄNDERTES AMINOSÄURENSPEKTRUM BEI ALTEN TIEREN

Wie bereits die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse zeigen, bestehen zwischen den Befunden der alten und diabetischen Tiere erhebliche Unterschiede (Tab. D 15 und D 17). Während das Aminosäurenmuster der

diabetischen Tiere gegenüber dem der Kontrolltiere im wesentlichen unverändert ist, ist es bei den alten Tieren schon im SSK auffällig alteriert. Überraschenderweise steigt hier den Anteil des (3)-OH-Prolins, da ja von manchen Autoren als BM-spezifisch angesehen wird, im SSK auf 13 Promille an und übersteigt damit den Normalwert der GBM. Auch der Anteil des (4)-OH-Prolins nimmt im Alter zu, dagegen bleibt der Gehalt an OH-Lysin konstant.

Noch eindrucksvoller sind die Altersbefunde bei der GBM. Hier sind neben einer gleichfalls auftretenden starken OH-Prolin-Vermehrung (das (3)-OH-Prolin ist von 9 auf 27 Promille erhöht), Erhöhungen des OH-Lysin-Gehalts festzustellen. Diese sind insbesondere beim OH-Lysin mit einer Erniedrigung des Gehalts der entsprechenden nicht hydroxylierten Aminosäure verbunden. Unsere Befunde bestätigen damit die Ergebnisse von HOYER und SPIRO (1978), die bereits in einem Zeitraum von 160 Tagen signifikante Veränderungen der oben genannten Anteile beobachten konnten. Diese deutliche Vermehrung der für die GBM kennzeichnenden Elemente lassen hier im Gegensatz zur diabetischen Versuchsgruppe den Schluß auf eine echte quantitative Vermehrung der Kollagenkomponente zu (s. auch letztes Kapitel).

-- ABHÄNGIGKEIT DER SYNTHESERATE VOM WACHSTUM

Alle Untersuchungen der Altersabhängigkeit der Syntheserate stoßen auf die grundsätzliche Schwierigkeit, daß die Ergebnisse durch das Wachstum der Tiere beeinflußt werden. Bei den von uns als Kontrollgruppe in den Hauptversuchen verwendeten 19 Wochen alten Ratten kann mit praktisch abgeschlossenem Wachstum gerechnet werden. In den Vorversuchen wurden aber teilweise wesentlich jüngere, 8 Wochen alte Ratten untersucht (Tab. D 13).

So ergab sich als Nebenbefund in dieser Arbeit eine starke Abhängigkeit der Kollagensynthese vom Alter der Versuchstiere in der Wachstumsphase. Während die nach einem Tag in der Leber gefundene Prolinaktivität in allen Altersgruppen etwa gleich blieb, nahm bereits die

über Prolin gefundenen Aktivität im Verlauf der ersten Lebenswochen stark ab. Diese könnte man noch durch den Verdünnungseffekt des vermehrten extrazellulär liegenden Kollagens erklären, nicht jedoch die Abnahme der A_{sp} des OH-Prolins um mehr als eine Zehnerpotenz. Die Hydroxylierungsrate in den Schwanzsehnenfibrozyten und damit die Kollagenproduktion scheint in den ersten Lebenswochen oder mit Abschluß des Wachstums stark abzunehmen, nicht jedoch die Produktion der NCP-Proteine. Die Proteinsynthese in der Leber verändert sich während des Lebens der Ratte praktisch nicht. Dieses Ergebnis sollte bei möglichen Versuchsanordnungen und der Interpretation der Ergebnisse längerdauernder Versuche berücksichtigt werden.

-- SEHNENKOLLAGENUMSATZ IM ALTER

Die eigentlichen Hauptversuche ergaben bei der Versuchsgruppe der alten Tiere wesentlich geringere Streuungen in den Ergebnissen der A_{sp} (Tab. D 13). Diese Versuchstiere erschienen insgesamt in Hinblick auf Allgemeinzustand und Ergebnisse als im Vergleich zu Diabetes homogenere Versuchsgruppe.

Die Einbauraten in die Leber sind gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert, auch die A_{sp} des Prolins in Schwanzsehne und GBM ist nach einem Tag nur wenig erniedrigt. In Anbetracht der erhöhten Menge an extrazellulärem Kollagen kann man den Anstieg der A_{sp} des Prolins sicherlich als unverändert betrachten. Allgemein scheint bei den alten Tieren keine dem Diabetes vergleichbare Einschränkung der Proteinsynthese vorzuliegen.

Dennoch sind auch die Werte der A_{sp} des OH-Prolins nach einem Tag deutlich, auf etwa ein Drittel, vermindert. Nach Bezug der gefundenen Werte auf den höheren Anteil des extrazellulär liegenden Kollagens, der bei dem kollagen-spezifischen OH-Prolin linear in die Berechnung der A_{sp} eingeht, ergeben sich aber auch hier keine eindeutigen Veränderungen gegenüber der Normalgruppe für den Eintageswert und damit für die Syntheserate.

Führt man die gleiche Korrektur an dem Drei-Wochen-Wert durch, so liegen die sich ergebenden Werte über denen der Kontrollen. Es findet ein prozentual viel stärkerer Anstieg von einem Tag auf drei Wochen statt. Unter Berücksichtigung des Verlaufs der A_{sp} über Prolin und des während des ersten Tages erhöhten, dann vermindertem Vorläuferangebotes ist der Eintageswert in der gleichen Höhe wie der der Kontrollen, der Wert nach drei Wochen jedoch stark erhöht. Da man den Eintageswert als hauptsächlich synthesebedingt ansehen kann, der zweite Meßpunkt dagegen eher vom Abbau geprägt ist, scheint hier ein verlangsamter Abbau des SSK im Alter vorzuliegen. Diese Vermutung wird durch die Befunde von HAMLIN et al. (1975) unterstützt, die eine beschleunigte "Alterung" (im Sinne von Unverdaulichkeit durch Kollagenase) von Kollagen aus Sehnenbiopsien diabetischer Patienten beschreiben und somit ebenfalls Parallelen zwischen den Veränderungen des Kollagens im Alter und bei Diabetes sehen.

-- GBM-UMSATZ BEI ALTEN TIEREN

Insbesondere bei alten Tieren muß bei der Beurteilung des Verlaufs der A_{sp} in der GBM wie in anderen Kollagenstrukturen die Menge des extrazellulär liegenden Kollagens berücksichtigt werden. Das Verhältnis der kollagenproduzierenden Zellen zu fertigem Kollagen läßt sich aber in den Glomeruli nicht so einfach bestimmen wie in der Schwanzsehne. MC NELLY und DITTMER (1975) fanden bei elektronenoptischen Messungen der GBM-Dicke eine Zunahme auf fast das Doppelte bei Goldhamstern im Zeitraum von 19 Wochen bis zwei Jahren. ROMEN und MORATH (1979) kommen bei Ratten auf ähnliche Ergebnisse. Unter diesen Voraussetzungen läßt sich aus unseren Befunden bei alten Tieren keine dem Diabetes vergleichbare Einschränkung der Protein- oder Kollagensynthese ablesen. Der Verlauf der A_{sp} des OH-Prolins und des Prolins entspricht vielmehr initial in etwa dem der Kontrolltiere.

Der wesentlichste Befund ist - ähnlich wie in der Schwanzsehne - der, verglichen mit den anderen Versuchsgruppen, stärkste Anstieg der

OH-Prolin-Aktivität im Zeitraum von einem Tag bis drei Wochen. Unter Berücksichtigung des erniedrigten Vorläuferangebots deuten unsere Ergebnisse eine ähnliche Alteration des Kollagenturnover der GBM wie beim Diabetes an, nämlich eine Abbauhemmung.

V. Zur Pathogenese der Glomerulosklerose

Sicherlich ist man noch weit davon entfernt, die Frage nach der Formalpathogenese der diabetischen GS endgültig beantworten zu können. Bei der Komplexität des Problems können Einzelarbeiten wie diese nur sehr kleine Beiträge zur Lösung leisten. Dennoch soll jetzt versucht werden, eine Arbeitshypothese zu finden, mit der die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse weitgehend mit den bisher bekannten Fakten aus der Literatur in Einklang gebracht werden können.

Um die aus der Literatur bekannten Widersprüche bezüglich der Substruktur der GBM zu vermeiden, sahen wir die GBM als aus zwei Untereinheiten bestehend an (Abb. E 2), die folgendermaßen charakterisiert sind:

1. Eine stark OH-Prolin-haltige Glykoproteinkomponente, die aufgrund ihrer Aminosäurenzusammensetzung als kollagenähnlich bezeichnet werden darf.
2. Von OH-Prolin und anderen für Kollagen typischen Elementen freie Glykoproteine, die überdies kollagenase-fest sind und damit sicher kein Kollagen darstellen.

Auf Molekülgröße, Substruktur und sterische Eigenschaften der Komponenten soll hier nicht eingegangen werden, wahrscheinlich stellen diese auch keine Einheit dar (wie dies KEFALIDES (1972) vermutet), sondern bestehen aus mehreren Untereinheiten und der Übergang ist fließend (SPIRO 1976).

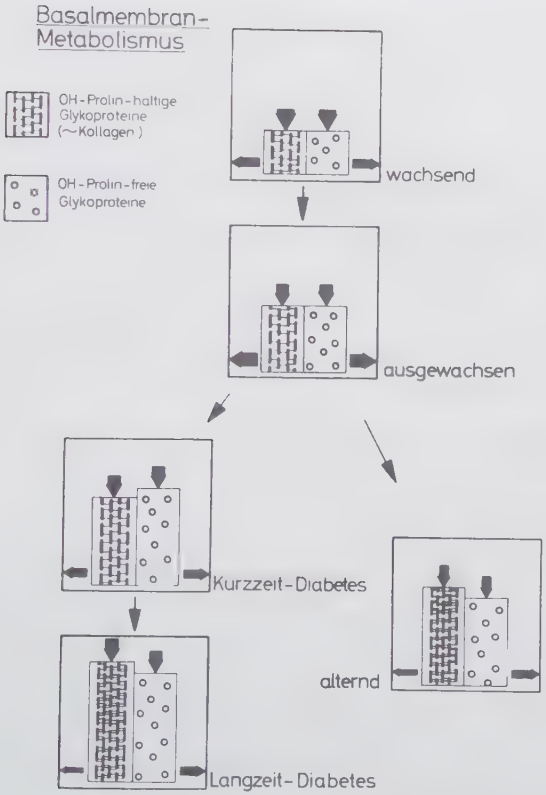


Abb. E 2 : Basalmembranmetabolismus

Hier erscheint es notwendig, noch einmal auf den Begriff des Kollagens Typ IV einzugehen. Er wurde 1972 von KEFALIDES auf Grund der biochemischen Aminosäurenzusammensetzung definiert. Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß die Basalmembran in ihrer Substruktur sicherlich keine den α-Ketten des Typ I Kollagens entsprechende Einheit bildet. Vermutlich lassen sich nur einige wenige Komponenten der GBM auf Grund ihres Hydroxyprolingehaltes als kollagenähnlich bezeichnen.

Es wird jedoch von uns für vertretbar gehalten, Synthese und Abbau dieser beiden Gruppen von Einzelkomponenten als in gewissem Umfang voneinander unabhängig zu betrachten. Für den Abbau der Kollagenkomponente sind nämlich entlang der GBM spezifische Enzyme nachgewiesen worden (MONTFORT und PEREZ-TAMAYO, 1975), die Synthese dieser in der Primärstruktur sehr verschiedenen Proteine sowie deren Glykosidierung und Ausschleusung dürfte weiterhin wohl ebenfalls getrennt erfolgen.

Damit wird der Umsatz der beiden Einzelkomponenten getrennt steuerbar, aber auch im pathologischen und physiologischen Zustand getrennt beeinflußbar.

In Abb. E 2 wird versucht, mit Hilfe dieses Modells eine Erklärung für die verschiedenen Zustandsformen der GBM in den einzelnen Entwicklungsstadien und beim DM zu finden.

In der WACHSTUMSPHASE, d.h. bei sehr jungen Tieren, ist die Dikkenzunahme der GBM auf die hier noch sehr hohe, gleichmäßige Syntheserate beider Komponenten zurückzuführen. Der Abbau ist hier wohl vorhanden, die relativ noch sehr hohe Synthese bedingt das Wachstum der Struktur. Dafür sprechen die von uns gefundenen wesentlich größeren Synthesewerte bei Tieren, die sich noch in der Phase schnellen Wachstums befanden.

Bei AUSGEWACHSENEN Tieren befindet sich die GBM im "steady-state": Synthese und Abbau halten sich die Waage.

Bei allen Formen der GLOMERULOSKLEROSE scheint die hauptsächliche Störung in einer allgemeinen Abbauhemmung zu liegen. Ein Grund für diese allgemeine Abbauhemmung läßt sich bisher nicht angeben. Die von FUSHIMI und TARUI (1978) festgestellte Erniedrigung der Aktivität von Glykosidasen, am Abbau der GBM beteiligter Enzyme, sowie die in eigenen Versuchen und von LAZAROW und SPEIDEL (1964) gefundenen Ergebnisse aus in-vivo Umsatzmessungen sprechen für die Tatsache an sich. Damit kann zwar die Dickenzunahme der

GBM beim experimentellen Langzeitdiabetes (CAMERON et al., 1973) und menschlichem Diabetes (s. ØSTERBY, 1972) erklärt werden, nicht jedoch die veränderte Aminosäurenzusammensetzung im Alter und beim Langzeitdiabetes.

Zur Erklärung dieser Befunde muß eine Alteration des SYNTHESE-Schenkels in Betracht gezogen werden. Tatsächlich scheinen die Erhöhung der Aktivität der Lysylhydroxylase (KHALIFA und COHEN, 1976) und der Glucosyltransferase (SPIRO und SPIRO, 1971) den beim menschlichen Langzeitdiabetes gefundenen erhöhten Gehalt an OH-Lysin und Glucosylgalactosedisaccharidbindungen zu bestätigen (BEISSWENGER und SPIRO, 1973, CRUZ und MOREAU-LALANDE, 1978). Daß dies nur beim Langzeitdiabetes gefunden wird, liegt aufgrund der sehr niedrigen Umsatzraten der Struktur auf der Hand: Selbst größere Veränderungen an der Synthese wirken sich nur sehr langfristig aus und führen zu einem meßbaren Effekt. Ähnliche Veränderungen wie beim Langzeitdiabetes des Menschen konnten wir und BEISSWENGER (1976) experimentell nicht nachvollziehen. Eine Synthesesteigerung scheint nur dann in Erscheinung zu treten, wenn der DM nur so ausgeprägt ist, daß der Gesamtmetabolismus nicht zu stark alteriert ist. Dies dürfte aber bei den meisten Versuchsmodellen - wie auch dem unseren - der Fall zu sein. Bei nicht so schwerer Beeinträchtigung ist aber durchaus mit einer gewissen Synthesesteigerung der GBM zu rechnen, die die einzelnen Enzyme auch unterschiedlich stark betreffen kann und somit zu Verschiebungen im Aminosäurenspektrum führt.

Ein prinzipiell ähnlicher Effekt scheint bei der ALTERS-GS vorzuliegen, denn auch hier ist die Aminosäurenzusammensetzung, wie eigene und die Untersuchungen von KALANT et al. (1977) zeigen, eindeutig gegenüber jungen Tieren verändert. Die in dieser Arbeit durchgeführte gleichzeitige Analyse von Typ I - Kollagen aus der Schwanzsehne beweist aber, daß dies in gewissem Umfang eine Allgemeinerscheinung des Kollagens im Alter sein dürfte, denn selbst "Typ IV-spezifische" Komponenten wie (3)-OH-Prolin sind im Alter in der Schwanz-

sehne erhöht. Hier können wiederum die unterschiedlich nachlassende Enzymaktivität im Alter als Erklärung herangezogen werden, aber auch reine "Lagerungseffekte". Kollagen verändert im Laufe des Lebens seine physikalischen Eigenschaften (VERŹAR 1964) und wird für Kollagenasen unverdaulicher (HAMLIN et al. 1975). In der GBM führen diese Effekte in Verbindung mit der allgemeinen Abbauhemmung zu einer zusätzlichen Abbauerschwernis der Kollagenkomponente. Diese wiederum bewirkt dann, da ja die GBM auch aus der Nichtkollagenkomponente besteht, eine weitere Verschiebung des Aminosäurenspektrums zu Gunsten der kollagentypischen Anteile. Selbstverständlich ist daneben als allgemeine Alterserscheinung der Umsatz der GBM aufgrund nachlassender Enzymaktivität des auf- und abbauenden Schenkels erniedrigt.

Beim Langzeitdiabetes, auf den nun noch einmal eingegangen werden soll, könnten sich die oben genannten Effekte möglicherweise addieren. Die - noch ungeklärte - "diabetische" Abbauhemmung gesellt sich zu den Altersveränderungen, die eine besondere Unverdaulichkeit der Kollagenkomponente bedingen. Hieraus könnte eine noch stärkere Dickenzunahme der GBM resultieren.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Formalpathogenese der diabetischen Glomerulosklerose ist noch weitgehend ungeklärt. Auf Grund der hierbei zu beobachtenden Basalmembranverbreiterung stehen zur Diskussion:

1. Eine Synthesesteigerung der BM-Bausteine.
2. Ihre Abbauhemmung im Sinne einer mesangialen Dysfunktion.

Das Problem wurde mit einer an Ratten durchgeführten in-vivo Tracerstudie mittels ^{3}H-Prolin angegangen. Die dabei auftretenden methodischen Schwierigkeiten sowie Fragen zur Metabolisierung der Tracersubstanz wurden eingehend in Vorversuchen abgeklärt. Als Referenzkollagen diente Typ I - Kollagen aus der Schwanzsehne, die Beziehung zur sogenannten Altersglomerulosklerose wurde durch parallel durchgeführte Untersuchungen an zwei Jahre alten Ratten hergestellt. Die Aminosäurenzusammensetzung der genannten Strukturen wurde ermittelt, die experimentell zu bestimmenden Verläufe der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins als Indikator des Kollagenumsatzes zuvor theoretisch errechnet.

Unsere Arbeiten ergaben eine starke Altersabhängigkeit der Kollagen-Turnoverraten. Das von uns gewählte Streprozotocin-Diabetes-Modell bedingt ebenfalls eine starke Einschränkung der Synthese. Die Aminosäurenanalyse der untersuchten Kollagene zeigte in dem von uns beobachteten Zeitraum keine wesentliche Änderung im Aminosäurenspektrum der diabetischen Tiere gegenüber gesunden, bei alten Tieren jedoch eine Zunahme der "kollagenspezifischen" hydroxylierten Aminosäuren. Die experimentell ermittelten zeitlichen Verläufe der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins entsprechen den zu erwartenden Kurven für langsam umsetzende Strukturen. Sie stimmen mit den errechneten Werten überein. Die Halbwertszeiten des Typ IV-Kollagens aus der glomerulären Basalmembran sind um den Faktor 10 kleiner als die des Schwanzsehnenkollagens. Die Form der Ver-

laufskurven läßt bei beiden Kollagenen für die diabetische Versuchsgruppe und die alten Tiere den Schluß auf eine Abbauhemmung zu.

Unabhängig von der - bisher noch nicht hinreichend geklärten - Substruktur der glomerulären Basalmembran deuten unsere Ergebnisse eine Vermehrung der kollagenhaltigen Komponenten im Alter und bei Langzeitdiabetes an. Die "Sklerosierung" bleibt jedoch nicht auf die Basalmembran beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf das Bindegewebe mit Typ I-Kollagen, beispielsweise die Sehne. Diese Befunde sind mit der Verbreiterung der glomerulären Basalmembran im Alter und bei lange bestehendem Diabetes mellitus sowie mit der in dieser Arbeit gefundenen Abbauhemmung durchaus in Einklang zu bringen.

G. LITERATURVERZEICHNIS

ALTMAN, P.L. und DITTMER, D.S. (Hrsg.):
Biology Data Book, Second Edition
Vol. III, S. 1191
Federation of American Societies for Experimental Biology, 1974, Bethesda, Maryland, USA.

BARGMANN, W.:
Niere und ableitende Harnwege.
Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen
7. Band: Harn- und Geschlechtsapparat 5. Teil
1. Ed. v. Möllendorff, W., 2. Ed. Bargmann, W.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1978.

BEISSWENGER, P.J.:
Glomerular Basement Membrane: Biosynthesis and Chemical Composition in the Streptozotocin Diabetic Rat.
J. Clin. Invest. 58, 844-852 (1976).

BEISSWENGER, P.J. und SPIRO, R.G.:
Human Glomerular Basement Membrane:
Chemical Alteration in Diabetes Mellitus.
Science 168, 596-598 (1970).

BEISSWENGER, P.J. und SPIRO, R.G.:
Studies on the human glomerular basement membrane:
Composition, nature of the Carbohydrate units and Chemical in Diabetes Mellitus.
Diabetes 22, 180-193 (1973).

BISCHOFF, A.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Nervenzellen beim menschlichen Diabetes Mellitus.
Proc. VI th Congr. lut. Diab. Fed. 1967 (1968).

BLUMENKRANTZ, N. und ASBOE-HANSEN, G.:
OH-Proline to OH-Lysine Molar Ratio Indicates Collagen Type
Acta Dermatovener 58, 111-115 (1978).

BOLTON, W.K., BENTON, F.R., MAC LAY, J.G. und STURGILL, B.C.:
Spontaneous Glomerular Sclerosis in Aging Sprague-Dawley Rats.
Amer. J. Pathol. 85, 277-300 (1976).

BRONSTEIN, I.N. und SEMENJAJEFF, K.A.:
Taschenbuch der Mathematik.
11. Aufl., S. 378, Verlag Harry Deutsch, Zürich und Frankfurt (1971).

BUTCHER, D., KIKKAWA, R., KLEIN, L. und MILLER, M.:
Size and Weight of Glomeruli Isolated from Human Diabetic and Nondiabetic Kidneys.
J. Lab. Clin. Med. 89, 544-553 (1977).

CAMERON, D.P., AMHERDT, M., LEUENBERGER, P., ORCI, L. und STAUFFACHER, W.:
Microvascular Alterations in Chronically Streptozotocin-Diabetic Rats.
Advances in Metabolic Disorders, Suppl. 2, 257-269 (1973).

CHOW, A.Y.K. und DRUMMOND, K.N.:
Incorporation and Hydroxylation of Proline-3-4-H^3 as an Index of Glomerular Basement Membrane Synthesis in Normal and Nephrotoxic Nephritic Rats.
Lab. Invest. 20, 213-218 (1969).

COHEN, M.P. und KHALIFA, A.:
Effect of Diabetes and Insulin on Rat Glomerular Protocollagen Hydroxylase Activities.
Biochim. Biophys. Acta 496, 88-94 (1977).

CRUZ, A. und MOREAU-LALANDE, H.:
Biochemical Studies on Glomerular Basement Membrane in Human Diabetic Microangiopathy.
Path. Biol. 26, 411-417 (1978).

FARQUHAR, M.G. und PALADE, G.E.:
Functional Evidence for the Existence of a Third Cell Type in the Renal Glomerulus. Phagocytosis of Filtration Residues by a Distinctive "Third" Cell.
J. Cell Biol. 13, 55-87 (1962).

FOIDART-WILLEMS, J., DECHENNE, C. und MAHIEU, P.:
Biosynthesis of Basement Membrane Collagen. In: Cultures of Renal Glomerular and Tubular Epithelial Cells.
Diab. Metabol. 1, 227-234 (1975).

FOX, C.J., DARBY, S.C. und IRELAND, J.T.:
Blood Glucose Control and Glomerular Capillary Basement Membrane Thickening in Experimental Diabetes.
Brit. Med. J. 2, 605-607 (1977).

FUSHIMI, H. und TARUI, S.:
β -Glycosidases and Diabetic Microangiopathy.
I. Decreases of β-Glycosidase Activity in Diabetic Rat Kidney.
J. Biochem. 79, 265-270 (1976).

GOLUB, L.M., GREENWALD, R.A., ZEBROWSKY, E.J. und RAMAMURTHY, N.S.:
The Effect of Experimental Diabetes on the Molecular Characteristics of Soluble Rat-Tail Tendon Collagen.
Biochim. Biophys. Acta 534, 73-81 (1978).

GOODMAN, M., GREENSPON, S.A. und KRAKOWER, C.A.:
The Antigenic Composition of the Various Anatomic Structures of the Canine Kidney.
J. Immunol. 75, 96-104 (1955).

GRANT, M.E., HARWOOD, R. und WILLIAMS, I.F.:
Increased Synthesis of Glomerular Basement Membrane Collagen in Streptozotocin Diabetes.
J. Physiol. 257, 56-57 (1976).

GUNDERSEN, H.J.G. und ØSTERBY, R.:
Glomerular Size and Structure in Diabetes Mellitus.
II. Late Abnormalities.
Diabetologia 13, 43-48 (1977).

HAMLIN, C.R., KOHN, R.R. und LUSCHIN, B.A.:
Apparent Accelerated Aging of Human Collagen in Diabetes Mellitus.
J. Amer. Diabetes 24, 902-904 (1975).

HARRISON, D.E. und ARCHER, J.R.:
Measurement of Changes in Mouse Tail Collagen with age: Temperature Dependence and Procedural Details.
Exp. Geront. 13, 75-82 (1978).

HOYER, J.R. und SPIRO, R.G.:
Studies on the Rat Glomerular Basement Membrane: Age-Related Changes in Composition.
Arch. Biochem. Biophys. 185, 496-503 (1978).

KALANT, N., SATOMI, S., WHITE, R. und TEL, E.:
Changes in Renal Glomerular Basement Membrane with Age and Nephritis.
Can. J. Biochem. 55, 1197-1206 (1977).

KAO, K.T., HILKER, D.M. und MC GAVACK, T.H.:
Connective Tissue. IV. Synthesis and Turnover of Proteins in Tissues of Rats.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 106, 121-124 (1961).

KEFALIDES, N.A.:
Structure and Biosynthesis of Basement Membranes.
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 6, 63-104 (1973).

KHAIRALLAH, E.A. und MORTIMORE, G.E.:
Assessment of Protein Turnover in Perfused Rat Liver.
J. Biol. Chem. 251, 1375-1384 (1976).

KHALIFA, A. und COHEN, M.P.:
Glomerular Protocollagen Lysil-Hydroxylase Activity in Streptozotocin Diabetes.
Biochim. Biophys. Acta 368, 332-339 (1975).

KIMMELSTIEL, P. und WILSON, C.:
Intercapillary Lesions in the Glomeruli of the Kidney.
Amer. J. Path. 12, 83-98 (1936).

KIVIRIKKO, K.I. und RISTELI, L.:
Biosynthesis of Collagen and its Alterations in Pathological States. Review Article.
Med. Biol. 54, 159-186 (1976).

KRAKOWER, C.A. und GREENSPON, S.A.:
Localization of the Nephrotic Antigen within the Isolated Renal Glomerulus.
Arch. Path. 51, 629-639 (1951).

KRISKO, I.:
Isolation and Characterization of Rat Tubular Basement Membrane.
Kidney 12, 238 (1977).

KURTZ, S.M. und FELDMAN, J.D.:
Experimental Studies on the Formation of the Glomerular Basement Membrane.
J. Ultrastruct. Res. 6, 19-27 (1962).

LAZAROW, A. und SPEIDEL, E.:
The Chemical Composition of the Glomerular Basement Membrane and its Relationship to the Production of Diabetic Complications.
In: Small blood vessel involvement in diabetes mellitus. Ed. by M.D. Siperstein, A.R. Colwell and K. Meyer. Amer. Inst. Biolog. Sciences, Washington D.C. (1964) p. 127-150.

LEBLOND, C.P., GLEGG, R.E. und EIDINGER, D.:
Presence of Carbohydrates with Free 1,2-Glycol Groups in Sites Stained by PAS-technique.
J. Histochem. Cytochem. 5, 445-458 (1957).

Mc CULLAGH, K.A. und BALIAN, G.:
Collagen Characterization and Cell Transformation in Human Atherosclerosis.
Nature 258, 73-75 (1975).

Mc MANUS, J.F.A.:
Histochemical Features of the Renal Basement Membrane.
Fed. Proc. 7, 275-276 (1948).

Mc NELLY, N.A. und DITTMER, J.E.:
Glomerular Basement Membrane Width and Proteinuria in the Aging Hamster Kidney.
Exp. Geront. 11, 49-55 (1975).

MILLER, E.J., RHODES, R.K., GAY, S. und KRESINA, T.F.:
Useful Appraches in the Isolation of the Collagenous Constituents of Basement Membranes.
Path. Biol. 26, 1-13 (1978).

MOGENSEN, C.E.:
Renal Function Changes in Diabetes.
J. Amer. Diab. Ass. 25, 872-879 (1976).

MONTFORT, J. und PEREZ-TAMAYO, R.:
The Distribution of Collagenase in Normal Rat Tissues.
J. Histochem. Cytochem. 23, 910-920 (1975).

MÜLLER, S.A. und WINKELMANN, R.K.:
Necrobiosis lipoidica diabeticorum.
Arch. Derm. 93, 272 (1966).

NEUBURGER, A. und SLACK, H.G.B.:
The Metabolism of Collagen from Liver, Skin, Bone and Tendon in the Normal Rat.
Biochem. J. 53, 47-52 (1953).

NIKLAS, A., QUINCKE, E., MAURER, W. und NEYEN, H.:
Messung der Neubildungsraten und biologischer Halbwertszeiten des Eiweißes einzelner Organe und Zellgruppen bei der Ratte.
Biochem. Zeitschrift 330, 1-20 (1958).

NIMNI, M.E., DE GUIA, E. und BAVETTA, L.A.:
Synthesis and Turnover of Collagen Precursors in Rabbit Skin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 117, 618-623 (1964).

NISSEN, R., CARDINALE, G.J. und UDENFRIEND, S.:
Increased Turnover of Arterial Collagen in Hypertensive Rats.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 451-453 (1977).

ØSTERBY, R.:
Morphometric Studies of the Peripheral Glomerular Basement Membrane in Early Juvenile Diabetes.
I. Development of Initial Basement Membrane Thickening.
Diabetologia 8, 84-92 (1972).

ØSTERBY, R. und GUNDERSEN, H.J.G.:
Glomerular Size and Structure in Diabetes Mellitus.
I. Early Abnormalities.
Diabetologia 11, 225-229 (1975).

PIEZ, K.A., EIGNER, E.A. und LEWIS, M.S.:
The Chromatographic Separation and Amino Acid Composition of the Subunits of Several Collagens.
Biochemistry 2, 58-66 (1963).

RANDERATH, E. und DIEZEL, P.B.:
Morphologische Pathologie der extrarenalen Angiopathie beim Diabetes.
In: Diabetes Mellitus, III. Congr. Intern. Diab. Fed. Düsseldorf, 1959, Georg Thieme, Stuttgart (1959).

REDDI, A.S.:
Diabetic Microangiopathy. I. Current Status of the Chemistry and Metabolism of the Glomerular Basement Membrane.
Metabolism 27, 107-125 (1978).

RISTELI, J., KOIVISTO, V.A., AKERBLOM, H.K. und KIVIRIKKO, K.I.:
Intracellular Enzymes of Collagen Biosynthesis in Rat Kidney in Streptozotocin Diabetes.
Diabetes 25, 1066-1070 (1976).

ROMEN, W.:
Zum Problem der Glomerulosklerose.
Veröffentlichungen aus der Pathologie 102, 1-102, Fischer Verlag Stuttgart (1976).

ROMEN, W. und MORATH, R.:
Diffuse Glomerulosclerosis - A Dysfunction of the Mesangium?
Virchows Arch. B Cell Path. In Druck (1979).

RUDAS, B.:
Streptozotocin.
Arzneimittel-Forschung 22, 830-861 (1972).

SATO, T., MUNAKATA, H., YOSHINAGA, K. und YOSIZAWA, Z.:
Chemical Composition of Glomerular and Tubular Basement Membranes of Human Kidney.
Tohoku J. exp. Med. 115, 299-306 (1975).

SIPERSTEIN, M.D., UNGER, R.H. und MADISON, L.L.:
Studies of Muscle Capillary Basement Membrane in Normal Subject, Diabetic and Prediabetic Patients.
J. Clin. Invest. 47, 1973-1999 (1968).

SODEK, J.:
A Comparison of the Rates of Synthesis and Turnover of Collagen and Non-Collagen Proteins in Adult Rat's Periodontal Tissues and Skin using a Microassay.
Archs. oral Biol. 22, 655-665 (1977).

SPIRO, R.G.:
Biochemistry of the Renal Glomerular Basement Membrane and its Alterations in Diabetes Mellitus.
New England J. Med. 288, 1377-1342 (1973).

SPIRO, R.G.:
Search for a Biochemical Basis of Diabetic Microangiopathy.
Diabetologia 12, 1-14 (1976).

SPIRO, R.G. und SPIRO, M.J.:
Effect of Diabetes on the Biosynthesis of the Renal Glomerular Basement Membrane. Studies on the Glucosyltransferase.
Diabetes 20, 641-648 (1971).

STEIGERWALD, U.:
Die Isolierung von glomerulären Basalmembranen. Vergleichende Untersuchungen an Ratten-, Mäuse- und Schweinenieren.
Inaug. Diss. Würzburg 1979.

TIMPEL, R.:
Struktur, Biosynthese und Immunologie des Kollagens.
Medizin unserer Zeit, 4, (1977).

UITTO, J.:
Collagen Biosynthesis in Human Skin. A Review with Emphasis on Scleroderma.
Ann. Clin. Res. 3, 250-258 (1971).

VERZAR, F.:
Aging of Collagen Fiber.
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 2, 243-300 (1964).

WARDLE, E.N.:
Mesangial Cell Dysfunction Detected by Accumulation of Aggregated Protein in Rats with Streptozotocin Diabetes.
Biomedicine 23, 299-302 (1975).

WEBER, B. und ROMEN, W.:
Persönliche Mitteilung (1978).

WEHNER, H. und MAYOREK, B.:
Early Glomerular Changes in Streptozotocin Diabetes of the Guinea Pig.
Virchows Archiv 368, 179-189 (1975).

WESTBERG, N.G. und MICHAEL, A.F.:
Immunohistopathology of Diabetic Glomerulosclerosis.
J. Amer. Diab. Assoc. 21, 163-174 (1972).

WOESSNER, J.F.:
In: Treatise on Collagen (Edited by Gould R.S.),
Vol. 2 B, Chap. 3, 253-329, Academic Press, London
(1968).

H. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A_{sp}	Spezifische Aktivität
BM	Basalmembran
DM	Diabetes mellitus
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GS	Glomerulosklerose
HWZ	Halbwertszeit
MG	Molekulargewicht
NCP	Non-Collagenous-Protein
NFF	Nichtflüchtige Fraktion (s. Kap. C.IV.)
OH-Pro, OH-Prolin	Hydroxyprolin
OH-Lys	Hydroxylysin
Pro	Prolin
SA	Spezifische Aktivität des freien Prolins im Serum
SLF	Säurelösliche Fraktion (s. Kap. C.VI.)
SSK	Schwanzsehnenkollagen
TCA	Trichloressigsäure
TBM	Tubuläre Basalmembran

An dieser Stelle gilt mein herzlichster Dank Herrn Professor Dr. W. Romen für die Überlassung des Themas, seinen stets freundlichen Rat und die große Unterstützung, die er mir jederzeit gewährte.

Herrn Professor Dr. H.-W. Altmann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Großen Dank schulde ich auch Herrn Professor Dr.Dr. K. Hempel, der mir die Durchführung der experimentellen Arbeiten am Inst. f. med. Strahlenkunde d. Univ. Würzburg ermöglichte und mir auch immer gerne Hilfe in Rat und Tat gewährte.

Herrn Dr. H.-W. Lange, Inst. f. med. Strahlenkunde d. Univ. Würzburg, danke ich dafür, daß er die Durchführung dieser Arbeit mit großem Interesse hinsichtlich praktischer und theoretischer Probleme unterstützte.

Zu großem Dank bin ich schließlich allen Damen des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg verpflichtet, insbesondere Frau H. Becker, Frau P. Steigerwald und vor allem Frau I. Gräf, die mit ihrer praktischen Hilfe die experimentelle Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

LEBENSLAUF

Am 15.12.1949 wurde ich als Kind der Eheleute Walter und Elisabeth Heck, geb. Krumm, in Aschaffenburg geboren. Nach Besuch der Volksschule von 1956 bis 1961 wurde ich in das Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Aschaffenburg aufgenommen. Diese Schule besuchte ich bis zum Abitur im Jahre 1970.

Danach begann ich an der Technischen Universität München das Studium des Maschinenbaus, dieses schloß ich als Diplom-Ingenieur für Luft- und Raumfahrttechnik im Frühjahr 1975 ab. Meine experimentelle Diplomarbeit erstellte ich am Inst. für Metallurgie und Metallkunde.

Bereits vor Abschluß des Ingenieurstudiums absolvierte ich mein Krankenpflegepraktikum. Unter Anrechnung eines Semesters begann ich dann im Frühjahr 1975 das Studium der Medizin in Würzburg. Nachdem ich im August 1979 das 2. medizinische Staatsexamen bestanden hatte, absolvierte ich das Praktische Jahr am Lehrkrankenhaus Aschaffenburg der Universität Würzburg.

Im November 1980 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Thomas Heck

Andreas Staudenraus Druckerei GmbH · Münzstraße 4 · 8700 Würzburg